

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA-INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA NO TRÓPICO ÚMIDO-PPG
ATU

MATHEUS MIRANDA CANIATO

**Manaus, Amazonas
Janeiro, 2018**

MATHEUS MIRANDA CANIATO

**PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E POTENCIAL DE INDUÇÃO DE
RESISTÊNCIA EM TOMATEIRO À MANCHA-ALVO MEDIADAS POR
RIZOBACTÉRIAS**

Orientador: Dr. Rogério Eiji Hanada

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura no Trópico Úmido – PPGATU, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Agricultura no Trópico Úmido.

**Manaus, Amazonas
Janeiro, 2018**

C 223 Caniato, Matheus Miranda

Promoção de crescimento e potencial de indução de resistência em tomateiro à mancha-alvo mediadas por rizobactérias / Matheus Miranda Caniato . --- Manaus: [s.n.], 2018.

xiv, 85 f.: il.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2018.

Orientador: Rogério Eiji Hanada

Área de concentração: Agricultura no Trópico úmido

1. Tomate. 2. Solanum lycopersicum. 3. Biocarvão. I. Título.

CDD 635.642



MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA NO TRÓPICO ÚMIDO

Folha de aprovação

A Banca Julgadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**TÍTULO: "PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E POTENCIAL DE
INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM TOMATEIRO À MANCHA
ALVO MEDIADAS POR RIZOBACTÉRIAS"**

AUTOR(A):

MATHEUS MIRANDA CANIATO

BANCA JULGADORA:


Dr. LUIZ ANTÔNIO DE OLIVEIRA (INPA)
(Membro)


Dr. LUADIR GASPAROTTO (EMBRAPA)
(Membro)


Dr. ALEKSANDER WESTPHAL MUNIZ (EMBRAPA)
(Membro)

Manaus, 30 de Janeiro de 2018

DEDICO

Aos meus pais José Maurílio Caniato e Mírian Miranda Caniato pelo amor e dedicação a mim dispensados, que foram indispensáveis em cada etapa da minha vida.

A minha esposa Sidiane Lira Caniato pelo amor e companheirismo incondicionais que permitiram a realização desse trabalho.

Em especial, ao meu filho amado Pedro Lucas Cristóvão Caniato por ser minha grande inspiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me conceder paz e serenidade para a realização desse sonho.

A minha família por sempre me apoiar de forma significativa com muito amor e carinho.

Ao INPA por me proporcionar as condições adequadas para aprimorar meus conhecimentos no curso de Pós-graduação em Agricultura no Trópico Úmido.

Ao meu orientador Dr. Rogério Eiji Hanada pela atenção e amizade estando sempre disposto a contribuir para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao técnico do Laboratório de Fitopatologia do INPA, Luiz Alberto pela amizade construída ao longo dos anos e pela contribuição na realização desse trabalho.

A Embrapa por ceder o espaço físico para realizar a identificação molecular dos isolados, bem como ao pesquisador Dr. Gilvan Ferreira da Silva, e aos técnicos Jeferson Chagas da Cruz e Karina Priscilla de Araújo Bichara pela imensa contribuição na identificação das rizobactérias, sempre prontos a ajudar na condução dos trabalhos com muito carinho e ética profissional.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma na realização desse trabalho e foram fundamentais na minha formação como homem e profissional.

RESUMO

A inoculação de rizobactérias visando o aumento da produtividade das culturas, por meio da promoção de crescimento e o manejo da mancha alvo por meio da indução de resistência sistêmica a doenças em plantas, mostram-se como ferramentas capazes de permitirem a expansão do cultivo de tomate na Região Norte. Assim, os objetivos desse trabalho foram avaliar a influência do biocarvão sobre a população de bactérias cultiváveis do solo, além da capacidade de colonização radicular dos isolados bacterianos, promoção de crescimento, solubilização de fósforo, produção de ácido indolacético e indução de resistência a *Corynespora cassiicola*. A influência da origem dos isolados sobre as variáveis mencionadas também foi avaliada. Assim como foi realizada a identificação dos isolados bacterianos. A influência do biocarvão sobre a população de bactérias cultiváveis do solo foi realizada por meio da metodologia de contagem de unidade formadora de colônias. A verificação da colonização radicular foi realizada por meio das técnicas de visualização de zonas de turbidez em tubos com ágar-água (0,8%), microscopia de luz e plaqueamento de raízes. A promoção de crescimento e a indução de resistência foram avaliadas em casa de vegetação e o delineamento experimental adotado para ambos os experimentos foi o inteiramente casualizado e a inoculação das bactérias foi realizada por microbiolização. A identificação foi realizada por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA. Os resultados indicaram que doses até 34 t ha⁻¹ influenciaram de forma positiva a população de bactérias cultiváveis do solo na camada de 0-10 cm. Os três métodos utilizados para avaliação da colonização radicular se mostraram eficientes e se complementaram na interpretação dos resultados. Os isolados ISO4T2, ISO22T3, ISO53T1, ISO17T3 e ISO113T1 promoveram incremento no teste de confirmação e apresentaram potencial para serem avaliados futuramente em campo. Os isolados, 7T1, 114T1 e 52T2 induziram resistência parcial a *C. cassiicola* e apresentaram potencial para serem avaliados em condição de campo. A origem dos isolados influenciou a capacidade de colonizar o sistema radicular de plântulas de tomateiro e de solubilizar fósforo. O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, permitiu identificar 23 isolados em nível de gênero e grupo, mas não em espécie.

PALAVRAS- CHAVE: *Solanum lycopersicum*, *Corynespora cassiicola*, biocarvão e *Bacillus* spp.

ABSTRACT

The use of rhizobacteria to increase crop productivity by promoting growth and management of the target spot through the induction of systemic resistance to plant diseases are shown as tool capable of allowing the expansion of tomato North region. Thus, the objectives of this work were to evaluate the influence of biochar in the population of cultivable soil bacteria, besides the root colonization capacity of bacterial isolates, growth promotion, phosphate solubilization, indole acetic acid production and induction of resistance to *Corynespora* almost. The influence of the isolates origin on the mentioned variables was also evaluated. As well as the identification of the bacterial isolates. The influence of the bio-carbon on the population of cultivable soil bacteria was carried out using the colony-forming unit counting methodology. Verification of root colonization was performed using techniques for visualizing turbidity zones in tubes with agar-water (0.8%), optical microscopy and root plating. Growth promotion and induction of resistance were evaluated in greenhouse and the experimental design adopted for both experiments was completely randomized and inoculation of the bacteria was performed by microbiolization. Identification was performed by sequencing the 16S rRNA gene. The results indicate that doses up to 34 t ha⁻¹ positively influence the population of cultivable soil bacteria in the 0-10 cm layer. The three methods used to evaluate root colonization were efficient and complement each other in the interpretation of the results. The isolates ISO4T2, ISO22T3, ISO53T1, ISO17T3 and ISO113T1 promoted an increment in the confirmation test and present potential to be evaluated in the field in the future. Isolates 7T1, 114T1 and 52T2 induced partial resistance against *C. cassiicola* and present potential to be evaluated under field conditions. The origin of the isolates has influence on the ability to colonize the root system of tomato plants and solubilize phosphate, but does not affect the other variables. The partial sequencing of the 16S rRNA gene allowed the identification of 23 isolates at the genus and group level, but not in species.

KEY WORDS: *Solanum lycopersicum*, *Corynespora cassiicola*, biochar and *Bacillus* spp.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Aspectos gerais sobre a cultura do tomate.....	3
2.2. Mancha-alvo do tomateiro.....	4
2.3. Aspectos gerais relacionados às rizobactérias.....	6
2.3.1. Promoção de crescimento vegetal mediada por rizobactérias.....	8
2.3.2. Indução de resistência sistêmica mediada por rizobactérias.....	9
2.4. Influência do biocarvão sobre a atividade de micro-organismos do solo.....	11
3. OBJETIVOS	13
3.1. Objetivo geral.....	13
3.2. Objetivos específicos.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1. Localização da área de estudo.....	14
4.2. Avaliação <i>in vitro</i> da influência do biocarvão sobre a população bacteriana do solo.....	14
4.2.1. Contagem de bactérias totais.....	14
4.3. Obtenção e seleção dos isolados bacterianos.....	15
4.3.1. Obtenção dos isolados.....	15
4.4. Avaliação da capacidade de colonização radicular.....	16
4.5. Avaliação da promoção de crescimento mediada por rizobactérias.....	17
4.5.1. Avaliação <i>in vitro</i> dos mecanismos de ação envolvidos na promoção de crescimento.....	18
4.5.1.1 Produção de ácido indol acético.....	19
4.5.1.2. Solubilização de fosfato.....	19
4.6. Avaliação do potencial de indução de resistência à <i>C. cassicola</i>	20
4.7. Avaliação da influência da origem dos isolados sobre as variáveis avaliadas.....	22
4.8. Caracterização fenotípica das rizobactérias com potencial de promoção de crescimento.....	22
4.9. Identificação dos isolados.....	22
4.9.1. Extração do DNA bacteriano.....	22
4.9.2. Reação de ERIC-PCR.....	23
4.9.3. Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.....	24
4.9.4. Filogenia.....	25
4.9.5. Identidade dos pares.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5. 1. Quantificação da influência do biocarvão sobre bactérias cultiváveis do solo.....	27
5.2. Avaliação da colonização radicular de plântulas de tomateiro por bactérias isoladas de solo com diferentes doses de biocarvão.....	29
5.3. Avaliação da promoção de crescimento de mudas de tomateiro em casa de vegetação.....	34
5.3.1. Screening dos isolados bacterianos.....	34

5.3.1.1. Caracterização e distribuição fenotípica das rizobactérias com potencial de promoção de crescimento.....	39
5.3.1.2. Reação de ERIC-PCR.....	43
5.3.1.3. Identificação das rizobactérias pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.....	45
5.3.2. Ensaio de confirmação no substrato Vivatto Plus®.....	51
5.3.3. Avaliação dos mecanismos envolvidos na promoção de crescimento.....	56
5.3.3.1. Solubilização de fosfato inorgânico na forma de CaHPO_4	56
5.3.3.2. Produção de ácido indol acético.....	59
5.4. Avaliação do potencial de indução de resistência a <i>Corynespora cassicola</i> por rizobactérias sobre mudas de tomateiro.....	61
5.4.1. Avaliação da incidência de <i>C. cassicola</i> em folhas de mudas de tomateiro.....	61
5.4.2. Avaliação da severidade de <i>C. cassicola</i> em folhas de tomateiro em casa de vegetação.....	63
6. CONCLUSÕES.....	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Atributos químicos do biocarvão incorporado ao solo em Manaus-AM, 2017.....	14
Tabela 2. Sistema da reação de ERIC-PCR.....	23
Tabela 3. Reagentes e volumes utilizados nas reações de sequenciamento do gene 16S rRNA.....	24
Tabela 4. Condições de amplificação nas reações de sequenciamento do gene 16S rRNA.....	25
Tabela 5. Análise de variância para a regressão polinomial do efeito de doses crescentes de biocarvão sobre as unidades formadoras de colônias do solo (UFC).....	27
Tabela 6. Capacidade de colonização radicular de 200 isolados bacterianos em plântulas de tomateiro, cultivar Santa Cruz Kada, in vitro em Manaus (AM), 2017.....	30
Tabela 7. Distribuição de frequência do resultado do teste de colonização radicular de 200 isolados bacterianos, segundo a origem em Manaus (AM), 2017.....	31
Tabela 8. Efeito de 53 isolados bacterianos na promoção de crescimento de mudas de tomateiro aos 20 dias após a semeadura no substrato Vivatto Plus®.....	35
Tabela 9. Distribuição de frequência referente ao teste de confirmação da promoção de crescimento de 25 isolados bacterianos, segundo a origem em Manaus (AM), 2017.....	39
Tabela 10. Caracterização dos 25 isolados que apresentaram resultados positivos no teste preliminar de promoção de crescimento.....	39
Tabela 11. Relação de identidade entre sequências obtidas neste estudo e sequências depositadas no GenBank.....	46
Tabela 12. Efeito de 25 isolados bacterianos na promoção de crescimento de mudas de tomateiro aos 20 dias após a semeadura no substrato Vivatto Plus®.....	51
Tabela 13. Distribuição de frequência do resultado do teste de confirmação da promoção de crescimento de 25 isolados bacterianos, segundo a origem em Manaus (AM), 2017.....	54
Tabela 14. Solubilização de fosfato de 25 isolados bacterianos provenientes de solo com doses crescentes de biocarvão em Manaus (AM), 2017.....	57
Tabela 15. Distribuição de frequência do resultado do teste de solubilização de fosfato de 25 isolados bacterianos, segundo a origem em Manaus (AM), 2017.....	58
Tabela 16. Caracterização dos 25 isolados positivos nos testes de promoção de crescimento quanto à produção de ácido indol acético.....	60
Tabela 17. Distribuição de frequência do resultado do teste de produção de ácido indol acético de 25 isolados bacterianos, segundo a origem em Manaus (AM), 2017.....	60
Tabela 18. Médias da incidência de <i>Corynespora cassiicola</i> em mudas de tomateiro cultivar Santa Cruz Kada inoculadas com 25 isolados de rizobactérias em Manaus (AM), 2017.....	61

Tabela 19. Médias da severidade (escala de notas) de <i>Corynespora cassiicola</i> em mudas de tomateiro cultivar Santa Cruz Kada, cujas sementes foram microbiolizadas com 25 isolados de rizobactérias em Manaus (AM), 2017.....	63
Tabela 20. Valores médios da Área abaixo da curva de progresso da mancha alvo (AACPD) pela escala de notas em mudas de tomateiro cv. Santa Cruz Kada em Manaus (AM), 2017.....	66
Tabela 21. Distribuição de frequência dos 25 isolados de rizobactérias quanto à indução de resistência (AACPD) a <i>C. cassiicola</i> , segundo a origem em Manaus (AM), 2017.....	69

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Relação entre doses de biocarvão e unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias cultiváveis do solo não rizosférico (0-10 cm).....	27
Figura 2. Método de observação, por zonas de turbidez, da colonização radicular de plântulas de tomateiro em agar-água (0,8%). A) Colonização parcial e B) Colonização total da raiz.....	32
Figura 3. A – I. Formação de biofilme em raízes de plântulas de tomateiro (<i>S. lycopersicum</i>). Visualização em microscópio óptico (aumento x 100).....	33
Figura 4. Colonização radicular de plântulas de tomateiro cultivar Santa Cruz Kada pelo ISO4T4 (A); Detalhe da colonização (B); e Visualização da colonização radicular em microscópio estereoscópio (C).....	33
Figura 5. Ganhos percentuais relativos a 26 isolados de rizobactérias comparados com o tratamento em água (Controle) para a variável comprimento da parte aérea (CPA). Tratamento controle considerado com índice de aumento igual a 0.....	36
Figura 6. Ganhos percentuais relativos à 18 isolados de rizobactérias comparados com o tratamento em água (Controle) para a variável diâmetro do caule aérea (DC). Tratamento controle considerado com índice de aumento igual a 0.....	37
Figura 7. Ganhos percentuais relativos à 11 isolados de rizobactérias comparados com o tratamento em água (Controle) para a variável número de folhas (NF). Tratamento controle considerado com índice de aumento igual a 0.....	37
Figura 8. Ganhos percentuais relativos à 24 isolados de rizobactérias comparados com o tratamento em água (Controle) para a variável massa seca da parte aérea (MSPA). Tratamento controle considerado com índice de aumento igual a 0.....	38
Figura 9. Visualização em microscópio óptico de 25 isolados positivos para promoção de crescimento no screening, por meio da técnica de coloração de Gram.....	41
Figura 10. Dendrograma gerado pelo agrupamento UPGMA, construído com base no coeficiente de similaridade de Bray-Curtis, a partir de dados da caracterização morfológica de 25 isolados de rizobactérias. Coeficiente de correlação ($r = 0,92$).....	42
Figura 11. Visualização do eletroferograma de 23 isolados bacterianos com perfis de bandas fornecidos pela técnica ERIC-PCR.....	43
Figura 12. Dendrograma gerado pelo agrupamento UPGMA, construído com base no coeficiente de similaridade de Jaccard, a partir da análise de bandas polimórficas geradas por Eric-PCR de 25 isolados de rizobactérias. Coeficiente de correlação = 0,916.....	45
Figura 13. Filograma resultante de um consenso de Máxima Verossimilhança e Análise Bayesiana baseado no alinhamento da região 16S rRNA, com os valores de bootstrap e probabilidade a posteriori. Os isolados obtidos neste estudo estão marcados em negrito e a árvore está enraizada na linhagem <i>Escherichia coli</i> J01859.....	48
Figura 14. Matriz de identidade pareada, codificada por cores, gerada a partir de 39 sequências da região 16S rRNA. Cada célula colorida representa uma	

pontuação percentual de identidade entre duas seqüências indicadas horizontalmente à esquerda e verticalmente na parte inferior. Uma tecla colorida indica a correspondência entre as identidades dos pares e as cores exibidas na matriz; As linhagens obtidas neste estudo estão identificadas entre parênteses.....	49
Figura 15. Ganhos percentuais relativos a 8 isolados de rizobactérias comparados com o tratamento em água (controle) para a variável diâmetro do caule (DC). Tratamento controle (Ctrl-) considerado com índice de aumento igual a 0.....	52
Figura 16. Ganhos percentuais relativos a 10 isolados de rizobactérias comparados com o tratamento em água (controle) para a variável massa seca do sistema radicular (MSSR). Tratamento controle (Ctrl-) considerado com índice de aumento igual a 0.....	53
Figura 17. Solubilização de fosfato inorgânico na forma de CaHPO_4 por rizobactérias.....	57
Figura 18. Produção de ácido indol acético por rizobactérias: diferentes padrões de cores.....	59
Figura 19. Curvas de progresso (escala de notas) de <i>Corynespora cassiicola</i> em mudas de tomateiro cultivar Santa Cruz Kada, cujas sementes foram microbiolizadas com 25 isolados de rizobactérias em Manaus (AM), 2017. Escala de notas: 0 – sem sintomas; 1 - < 1% de área lesionada; 2 – 1,1 a 3%; 3 – 3,1 a 6%; 4 - 6,1 a 12%; 5 – 12,1 a 25%; 6 – 25,1 a 50%; e 7 - >50%.....	65
Fig. 20. Progresso da mancha alvo e % de proteção (valores nas caixas) em tomateiro, cv. Santa Cruz Kada, cujas sementes foram microbiolizadas com os isolados ISO7T1, ISO114T1 E ISO52T2 e com <i>Bacillus cereus</i> - Ufv101. Asteriscos dentro de cada dia de avaliação representam valores diferentes entre tratamento e Ctrl-, de acordo com o teste Scott-Knott a um nível de significância de 5%.....	67

1. INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicon* L.) é uma das hortaliças mais importantes do mundo (Naika *et al.* 2006). No âmbito do agronegócio, conforme dados da safra 2013, a China é o maior produtor e o Brasil ocupa a sétima colocação na produção desse fruto (Faostat 2015). O seu consumo contribui para uma dieta saudável e bem equilibrada, pois os frutos são ricos em sais minerais, vitaminas, aminoácidos essenciais, açúcares e fibras dietéticas. Por se tratar de uma cultura de ciclo curto e com possibilidade de se obter altos rendimentos, há uma tendência de aumento da área cultivada (Naika *et al.* 2006). Entretanto, o aumento da área cultivada envolve desmatamento que, por sua vez, causa sérios impactos ambientais. Dessa forma, é mais razoável optar pelo aumento da produtividade, ou seja, da produção por unidade de área, visto que assim há possibilidade de obtenção de maiores lucros sem necessidade de supressão vegetal.

O cultivo do tomateiro no Amazonas é bastante incipiente e as doenças constituem-se como um dos fatores limitantes ao cultivo dessa espécie no estado. Conforme mencionado por Lopes *et al.* (2005), a mancha alvo causada pelo fungo *Corynespora cassiicola* (Berk e M. A. Curtis) C.T. Wei. está entre as doenças mais importantes que atacam a parte aérea do tomateiro na região Norte do país. Devido ao clima quente e úmido nesta região, a doença pode provocar grandes perdas quando medidas preventivas não são aplicadas corretamente.

Ainda não há produtos registrados no Ministério da Agricultura que sejam prescritos para a cultura do tomateiro (Agrofit 2017), sendo o controle da doença realizado por meio da aplicação de fungicidas recomendados para a cultura da soja (Reis e Boiteux 2007) como o Carbendazim Nortox® e o Comet®, cujos ingredientes ativos são o benzimidazol e a estrobirulina, respectivamente (Agrofit 2017) e através de medidas de controle cultural e mecânico (Coelho Netto *et al.* 2012). Contudo, os danos provocados pela utilização de defensivos químicos já são bastante conhecidos, como a contaminação da água, ar, solo, homem e animais. Além disso, o patógeno caracteriza-se por ser não específico, afetando uma ampla gama de plantas (Ellis e Holliday 1971; Silva *et al.* 1995), o que dificulta o manejo da doença. Nesse sentido, há alguns anos, a busca por métodos alternativos ao uso de defensivos agrícolas no controle de doenças de plantas, como a utilização de rizobactérias, tem sido alvo de inúmeras pesquisas no Brasil e no mundo.

Pelo exposto, a utilização de rizobactérias visando o aumento da produtividade das culturas, por meio da promoção de crescimento e o manejo da mancha alvo por meio da indução de resistência sistêmica mostram-se como ferramentas capazes de contribuir para a expansão do cultivo do tomateiro na região. As rizobactérias são micro-organismos não patogênicos que vivem na rizosfera (Freitas 2007) ou no rizoplano (Moreira e Siqueira 2006; Brady e Weil 2012) que, além de promoverem o crescimento das plantas (Oliveira *et al.* 2006), podem atuar como antagonistas contra diversos fitopatógenos (Araújo *et al.* 2005; Raaijmakers *et al.* 2009), aumentar a tolerância das plantas à seca (Bashan e De-Bashan 2005), bem como induzir resistência a uma ampla gama de fitopatógenos (Van Loon *et al.* 1998).

Nesse sentido, pesquisas realizadas com biocarvão mostram que a sua incorporação ao solo pode beneficiar micro-organismos como as rizobactérias, o que poderia aumentar as chances de estabelecimento em campo seja servindo como abrigo físico evitando predação ou como demonstrado em estudo mais recente realizado por Masiello *et al.* (2013), interferindo na sinalização microbiana de detecção de *quorum sensing*, o qual Hale *et al.* (2014) ressaltam ser um mecanismo de comunicação essencial para a colonização radicular.

Dentro deste contexto, o estudo teve como objetivos avaliar a atuação do biocarvão sobre as bactérias do solo, bem como, a capacidade das mesmas em promover crescimento e induzir resistência do tomateiro à mancha-alvo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos gerais sobre a cultura do tomateiro

O tomateiro é uma dicotiledônea, pertencente à ordem Tubiflorae e família Solanaceae. Esta é uma das famílias mais importantes do reino vegetal para a humanidade por possuir várias espécies comestíveis (Minami e Haag 1989) como, a batata (*Solanum Tuberosum* L.), o pimentão (*Capsicum annuum* L.) e a berinjela (*Solanum melongena* L.) (Naika *et al.* 2006). Segundo Filgueira (2000), o tomateiro é a segunda olerícola cultivada no mundo, sendo superado em quantidade produzida, apenas pela batata.

Originário da zona andina da América do Sul, o tomateiro foi domesticado no México e, por volta de 1544, introduzido na Europa. Em seguida, disseminou-se da Europa para a Ásia meridional e oriental, África e Oriente Médio (Naika *et al.* 2006). Para o Brasil foi trazido na época da colonização, mas seu cultivo só teve grande expansão após o fluxo das imigrações nas regiões Sudeste e Sul. Somente a partir de 1970, o cultivo do tomateiro expandiu suas fronteiras para outros estados (Pbmh 2003).

O tomate pode ser consumido fresco, em saladas, ou cozido, em molhos, sopas e carnes ou pratos de peixe. Pode ser processado em purês, sumos e molho de tomate (*ketchup*). Frutos enlatados e secos também constituem produtos processados de importância econômica (Naika *et al.* 2006). É um alimento funcional devido aos altos teores de vitaminas A e C, além de ser rico em licopeno. Pesquisas apontam que o consumo dessa substância, presente tanto no fruto fresco como no processado, ajuda a prevenir cânceres, principalmente àqueles relacionados ao aparelho digestivo (Carvalho e Pagliuca 2007).

O maior produtor mundial de tomate é a China com uma produção de 50.552.200 t, seguida da Índia com 18.227.000 t e dos Estados Unidos com 12.574.550 t na safra 2013. Atualmente, o Brasil ocupa o sétimo lugar no ranking da produção mundial deste fruto, com uma produção de 4.187.646 t numa área colhida de 62.687 ha (Faostat 2015) Enquanto na Europa e nos Estados Unidos o crescimento médio entre os anos de 1885 e 2005 foi de 30% e 45%, respectivamente, a produção brasileira de tomate quase duplicou neste período (Carvalho e Pagliuca 2007).

A produção agrícola desta cultura no Brasil é bastante desenvolvida, e apresenta maior importância na economia das regiões Sudeste e Centro-Oeste, onde estão localizadas as maiores empresas de processamento de tomate industrial (Picanço *et al.*

2004; Goiás 2005). Segundo dados da safra 2013, o Estado de Goiás é o maior produtor nacional com produção estimada em 1.317.607 t em uma área plantada de 15.679 ha, seguido de São Paulo com 885.894 t em 12.086 ha e Minas Gerais com 563.325 t em 8.151 ha (Ibge 2015). A produtividade média no Brasil é de aproximadamente 58 t ha⁻¹, sendo que produtores mais tecnificados chegam a atingir mais de 100 t ha⁻¹ (Carvalho e Pagliuca 2007).

A produtividade do tomateiro é influenciada por diversos fatores ambientais, como variações intermitentes de umidade, temperatura, incidência de radiação, ventilação, composição e teor de nutrientes no solo, além da ação de patógenos como bactérias, fungos, vírus e nematoides (Silva e Giordano 2000). São relatadas cerca de 200 doenças abióticas e bióticas afetando o tomateiro em todo o mundo. Embora apenas uma média de cinco dessas doenças ou distúrbios apareça simultaneamente, sua ocorrência pode resultar em grandes prejuízos, podendo ser um fator limitante para a cultura em algumas épocas de plantio e em determinadas regiões do Brasil, pela falta de controle eficiente ou pela elevação do custo de produção com a aplicação de defensivos agrícolas (Lopes *et al.*, 2005). Segundo Silva e Giordano (2000), a cultura exige grandes investimentos fitossanitários, com aplicações de defensivos a cada três dias desde a emergência até a colheita.

Entre os fatores envolvidos na redução da produtividade do tomateiro, as doenças causadas por fungos, assumem papel de destaque. Os fungos e pseudofungos são os responsáveis pelo maior número de doenças em plantas, constituindo-se no principal entrave a cultura do tomateiro (Kurozawa e Pavan 1997; Lopes *et al.* 2005). Aproximadamente 15% dos custos de produção são referentes ao uso de fungicidas no controle doenças causadas por estes patógenos (Lopes *et al.* 2005).

2.2. Mancha-alvo do tomateiro

A mancha-alvo do tomateiro, doença comum em quase todas as regiões produtoras de tomate do mundo (Ellis e Holliday 1971), é relatada como causadora da queda prematura das folhas nesta espécie (Blazquez 1972). O primeiro relato desta doença, em nível mundial, sobre tomateiro foi feito por F. C. Deighton, em Serra Leoa (Wei *et al.* 1950). Somente na década de 1980, o fungo foi detectado no Brasil, em cultivos de tomateiro, no município de Manaus, estado do Amazonas (Alves *et al.* 1985).

O agente etiológico da mancha-alvo do tomateiro é o fungo *Corynespora cassiicola* (Berk. e M. A. Curtis) C. T. Wei, que apresenta extensa distribuição mundial, em países tropicais e subtropicais (Kurt 2005), infectando uma ampla gama de plantas (Blazquez 1991). Além do tomateiro, o patógeno afeta dezenas de espécies cultivadas, como a soja (*Glicine max* L.) (Yorinori e Homechim 1977), o mamoeiro (*Carica papaya* L.), o cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) (Duarte *et al.* 1983), a acerola (*Malpighia glabra* L.) (Silva *et al.* 1997), a alface (*Lactuca sativa* L.) (Santos *et al.* 2007) e o pepino (*Cucumis sativus* L.) (Verzignassi *et al.* 2003). No Brasil, a mancha alvo do tomateiro apresenta grande importância principalmente na região Norte e no estado do Maranhão (Lopes *et al.* 2005), em virtude das condições climáticas predominantes nestas regiões, ambas com temperatura e umidade elevadas. Entretanto, epidemias severas desta doença também foram ocorreram em tomateiros cultivados em casa-de-vegetação nos estados do Paraná e Rio Grande do Sul nos anos de 2005 e 2006, respectivamente. Nestas epidemias, o patógeno infectou principalmente os frutos, tanto os verdes como os maduros, gerando prejuízos diretos aos produtores (Reis e Boiteux 2007).

Os sintomas iniciam com pequenas lesões aquosas na superfície da folha. Estas gradualmente aumentam em tamanho, e se tornam circulares com coloração marrom clara, circundadas por halos amarelos (Blazquez 1991; Cerkauskas 2005). Em outros órgãos da planta, como em ramos e pecíolos apresentam lesões amarronzadas e alongadas. Enquanto que nos frutos jovens, os sintomas iniciais são caracterizados por pontuações marrom-escuras e circulares. Estas ao aumentarem em tamanho, tornam-se marrons com um centro mais claro, que pode rachar, formando “crateras” nos frutos. Em frutos maduros desenvolvem lesões circulares marrons, com centro mais claro, que racham (Reis e Boiteux 2007). É comum esses sintomas, principalmente nos estádios iniciais, serem confundidos com os da pinta-preta (*Alternaria solani* (Ellis e G. Martin) L. R. Jones e Grout), mancha-bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria (Doidge) Dye) e pinta-bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. tomato (Pst) (Okabe) Young, Dye e Wilkie) (Jones *et al.* 1991; Pernezny e Simone 1999; Cerkauskas 2005; Andrade 2012).

O fungo apresenta colônia de coloração cinza ou marrom-clara em meio de cultura. Os conidióforos são longos, de coloração geralmente marrom-clara. Os conídios podem ser produzidos isoladamente ou em cadeias de dois a seis, sendo retos ou

levemente curvados, cilíndricos, lisos, apresentam coloração de sub-hialina a marrom-claro e quatro a vinte pseudosseptos (Blazquez 1991). A base do conídio apresenta um hilo pronunciado característico que pode ajudar na identificação (Pernezny e Simone 1999).

O progresso da doença é favorecido por temperaturas entre 20 e 28 °C (Blazquez 1991; Cerkauskas 2005), porém, a infecção ocorre entre 16 e 32 °C, sendo que longos períodos (entre 16 e 44 horas) de alta umidade são necessários para o ótimo desenvolvimento da doença (Blazquez 1991). Além disso, o período de molhamento foliar também influencia no desenvolvimento de *C. cassiicola* (Cerkauskas 2005). Kwon *et al.* (2003), em experimento realizado com *C. cassiicola* em pepino, relataram que períodos longos de orvalho associado a altas temperaturas aumentam a severidade da doença. O patógeno pode sobreviver em restos culturais, sementes contaminadas e infectando diversas plantas hospedeiras (Cutrim e Silva 2003). A disseminação do patógeno a longa distância é feita pela semente e a curta distância principalmente pelo vento (Blazquez 1991).

Cultivares comerciais de tomateiro resistentes à mancha-alvo não estão disponíveis no mercado, embora fontes de resistência já tenham sido identificadas em outros países. Algumas práticas culturais como destruição de lavouras velhas, restos de cultura, rotação de culturas (Blazquez 1991; Lopes *et al.* 2005), evitar o cultivo do tomateiro próximo ou em consórcio com outras hortaliças como abóbora (*Curcubita* sp), maxixe (*Cucumis anguria* L.), pimentão, quiabeiro (*Abelmoschus esculentus* L.) e vinagreira (*Hibiscus sabdariffa* L.), pois as mesmas são suscetíveis à mancha-alvo fontes de inóculo da doença, além da erradicação de plantas invasoras como trapoeraba (*Commelina benghalensis* L.) e assa peixe [*Veronia cinerea* (L.) Less.], hospedeiras do patógeno (Cutrim e Silva 2003), que podem contribuir para diminuir as fontes de inóculo no campo e, dessa forma auxiliar no controle da doença. Nesse contexto, o controle biológico, por meio de micro-organismos como as rizobactérias surge como mais uma alternativa ao uso de defensivos químicos que pode contribuir no manejo da mancha-alvo do tomateiro.

2.3. Aspectos gerais relacionados às rizobactérias

Sabe-se que a maioria dos micro-organismos não são patogênicos e grandes avanços foram feitos na última década com relação as interações de plantas com micro-

organismos benéficos, devido ao aumento significativo das pesquisas relacionadas aos micro-organismos presentes no solo, entre eles as rizobactérias (Austim e Ballaré 2014). A importância destes micro-organismos está relacionada, em grande parte, ao papel vital que desempenham em processos do solo que têm relação direta com a produtividade das culturas (Nandal e Hooda 2013).

O solo aderido às raízes das plantas é um sítio de intensa atividade microbiana devido à presença de exsudatos radiculares e rizodeposições de nutrientes, como aminoácidos, polissacarídeos e outros compostos específicos (Pires *et al.* 2005; Smalla *et al.* 2006). Estes exsudatos liberados pelo sistema radicular atraem os micro-organismos por serem fonte de nutrientes para eles e, assim, as plantas diversas vezes se beneficiam da presença destes micro-organismos (Nandal e Hooda 2013), na zona estreita de solo diretamente em torno do sistema radicular denominada de rizosfera (Walker *et al.* 2003), bem como no rizoplano, referido como a superfície da raiz incluindo as partículas de solo aderidas fortemente a ela (Barea *et al.* 2005; Kennedy 2005). Em virtude da alta concentração de nutrientes, a rizosfera e o rizoplano são colonizados por micro-organismos mais intensamente que as demais regiões do solo (Nandal e Hooda 2013).

Embora grande número de micro-organismos como bactérias, fungos, protozoários e algas coexistam na rizosfera (Saharan e Nehra 2011), as bactérias são os mais abundantes (Lynch 1990). Para Andrews (1992), isso se deve ao fato que as bactérias são os micro-organismos com a maior capacidade competitiva de colonização, pois o início do processo ocorre na semente, ou após a emissão da radícula e sua distribuição acompanha o crescimento das raízes, principalmente nas células epidérmicas, onde se encontram as maiores concentrações de exsudatos e de nutrientes, bem como menor oscilação de temperatura e de umidade, favorecer seu estabelecimento.

As rizobactérias promotoras de crescimento (RPCP's) são bactérias de vida livre (MAYAK *et al.*,1999), que colonizam tanto a rizosfera (Campos 2010) como o rizoplano (Moreira e Siqueira 2006). Elas se beneficiam dos nutrientes segregados pelas raízes (Nandal e Hooda 2013) e podem direta ou indiretamente facilitar o enraizamento (Mayak *et al.*1999), bem como promover o crescimento vegetal (Glick 1995). Além disso, algumas rizobactérias são capazes de induzir resistência sistêmica contra uma ampla gama de fitopatógenos como fungos, bactérias, vírus, nematoides e insetos (Dashti *et al.* 1998; Nandakumar *et al.* 2001; Silva *et al.* 2004; Romeiro 2007).

Entre as rizobactérias, as mais comuns são bactérias gram-negativas, sendo que espécies de *Pseudomonas* são predominantes na rizosfera (Hernández 2000; Rathore 2014), porém uma grande diversidade de bactérias de gêneros diferentes pode colonizar o sistema radicular, incluindo *Bacillus*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Klebsiella* e *Mesorhizobium* (Campos 2010).

2.3.1. Promoção de crescimento vegetal por rizobactérias

A utilização de rizobactérias visando o aumento da produtividade das culturas por meio da promoção de crescimento é uma prática bastante difundida (Freitas 2003; Harthmann *et al.* 2009; Batista 2017)

Entre os principais mecanismos de ação aventados para as rizobactérias em relação à promoção de crescimento vegetal estão à produção de fitormônios, como as auxinas (ácido-indol-acético), as quais são estimulantes do crescimento vegetal, o aumento do acesso a nutrientes pela solubilização do fosfato e a produção de HCN (ácido cianídrico) (Wani *et al.* 2007; Vyas e Gulati 2009). Alguns estudos indicam que *Pseudomonas* spp. (Ahmad *et al.* 2008) e *Bacillus* spp. (Karuppiyah e Rajaram 2011) são capazes de produzir HCN, o qual estimula o crescimento vegetal direta, indireta e sinergicamente (Joseph *et al.* 2007). Wani *et al.* (2007), avaliando isolados provenientes da rizosfera de grão de bico (*Cicer arietinum* L.) observaram que as plantas da mesma espécie quando tratadas com rizobactérias apresentaram incrementos significativos no crescimento devido à produção de HCN.

Apesar da alta capacidade de competição no que tange à colonização radicular, diversos pesquisadores, mencionam a inconstância dos resultados referentes à promoção de crescimento vegetal por RPCPs (Freitas *et al.* 2003). Uma das hipóteses é a dificuldade de dispersão pelos micro-organismos inoculados, do local de aplicação (semente), para a rizosfera ou rizoplano; locais de efetivo estabelecimento, não havendo conseqüentemente a colonização do sistema radicular da planta. Por outro lado, Suslow (1982) sugere que as condições ambientais são fatores responsáveis pela baixa capacidade de dispersão das RPCPs.

Além disso, o estado nutricional do solo, pH, tipo de solo, genótipos de plantas e a competência dos micro-organismos indígenas podem limitar a competição entre bactérias, podendo resultar em ausência de colonização radicular (Jemba e Alexander 1999). Freitas *et al.* (2003), avaliando a promoção do crescimento de alface mediada por

rizobactérias, obtiveram diferentes respostas quando isolados de *Pseudomonas* spp. foram submetidos a diferentes substratos com diferentes concentrações de nutrientes, sugerindo que a capacidade de promoção de crescimento está possivelmente ligada à fatores nutricionais presentes no substrato.

Cabe salientar que para haver um ganho real na promoção de crescimento vegetal é essencial que haja uma relação íntima entre as rizobactérias e a planta hospedeira (Vessey 2003) e que as RPCP's, além de serem capazes de colonizar as raízes, sobreviver e se multiplicar, devem estar aptas a competir com os micro-organismos presentes no solo de modo a promover o crescimento da planta (Harthmann 2009).

A promoção no crescimento vegetal promovida por rizobactérias pode ser detectada e quantificada pelo aumento em diversos parâmetros, como na emergência e altura da parte aérea de diversas espécies de plantas (Kloepper 2003; Lucy *et al.* 2004), bem como pela melhoria na textura, tamanho e massa dos frutos, conforme observado por Mena-Violante e Olalde-Portugal (2007), por meio da utilização de *Bacillus subtilis* (Ehrenberg 1835) Cohon 1872, em tomateiro. Além disso, alguns testes *in vitro* podem ser realizados para avaliar a capacidade das RPCP's em produzirem HCN, indóis e solubilizar fosfato. A produção destes metabólitos está, geralmente, associada ao ganho promovido no crescimento das plantas.

2.3.2. Indução de resistência sistêmica mediada por rizobactérias

Há mais de 100 anos, sabe-se que plantas podem pré-condicionar defesas em resposta a patógenos e parasitas de várias escalas, desde vírus a insetos herbívoros (Heil e Bostock 2002; Vallad e Goodman 2004). Também é fato que as plantas podem ter seus mecanismos de defesa ativados por meio de agentes bióticos, como as rizobactérias. Neste contexto, a utilização de rizobactérias como indutoras de resistência sistêmica em plantas é uma vertente que tem sido amplamente estudada por diversos pesquisadores (Nikoo *et al.* 2014; Bernardes *et al.* 2010).

Quando uma rizobactéria coloniza o sistema radicular da planta, moléculas constituintes da célula bacteriana ou por ela sintetizadas chamadas de eliciadores são capazes de ativar respostas de defesa nas plantas, podendo neste caso atuarem como indutores de resistência (Smith 1996; Sticher *et al.* 1997), promovendo o aumento do nível de resistência sem alteração genômica da planta tratada. Segundo Campos (2010),

os principais sinais endógenos que atuam como eliciadores no fenômeno de indução de resistência mediada por rizobactérias são o ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno. Vale ressaltar que o fenômeno de indução de resistência pode acontecer por meio de duas rotas metabólicas diferentes, respectivamente, Resistência Sistêmica Induzida (RSI) e Resistência Sistêmica Adquirida (RSA) (Romeiro 2007).

Conforme mencionado por alguns autores, na RSI não há acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (PRP's), a planta que sofreu indução não exibe alterações visuais, o agente indutor é usualmente um não patógeno e sua indução não é salicilato-dependente, havendo outra rota de sinalização mais associada à jasminatos e etileno (Pieterse *et al.* 1998; Van Loon *et al.* 1998). Entretanto, Van Loon *et al.* (1997) relatam que em alguns casos a RSI possa ser, idêntica a resistência sistêmica adquirida (RSA), não só fenotipicamente, mas também no que se refere ao mecanismo, levando ao acúmulo de proteínas PR's e salicilato-dependente. Jeun *et al.*, (2004), em experimento utilizando duas rizobactérias – *Serratia marscesens* Bizio, 1823 (90-166) e *Pseudomonas fluorescences* Mingula (89B61) – relataram que as mesmas induziram RSI contra antracnose (*Colletotrichum orbiculare* (Berk. & Mont.) Arx), do pepino e que a exposição de plantas à ácido amino-salicílico proporcionou o mesmo efeito.

A RSI depende, entre outros fatores, do intervalo de tempo entre o tratamento inicial com a rizobactéria e a subsequente inoculação do patógeno desafiante (Steiner e Schönbeck 1995; Romeiro 1999). Teixeira *et al.* (2005), avaliando indução de resistência sistêmica, mediada por isolados de rizobactérias sobre a ferrugem (*Puccinia psidii* Winter) do eucalipto (*Eucalyptus* spp.), observaram menor eficiência na redução da severidade, quando as mudas foram tratadas com os isolados apenas uma semana antes da inoculação com o patógeno, em relação ao tratamento aos 80 dias. Assim, a existência dessa dependência indica que alterações específicas no metabolismo da planta, envolvendo síntese e, ou acúmulos de substâncias são importantes na indução de resistência (Pascholati e Leite 1995; Ryals *et al.* 1996).

Vale salientar que para se evidenciar ou não a ocorrência de indução de resistência sistêmica é imprescindível que haja separação espacial entre o patógeno desafiante e o agente indutor (rizobactéria). Neste sentido, Wei *et al.* (1991), avaliando a indução de resistência em pepino promovida por rizobactérias, observaram que o tratamento de sementes com seis isolados de rizobactérias resultou consistentemente na supressão da antracnose causada por *C. orbiculare*. Sendo sugerido pelos autores que o antagonismo não foi o mecanismo envolvido na supressão da doença, pois o patógeno

desafiante e os isolados foram separados espacialmente, o que caracteriza dessa forma a ocorrência de indução de resistência.

Depois de estabelecida, a indução de resistência pode durar dias, semanas ou até mesmo todo o ciclo de vida da planta, atuando dessa forma como um mecanismo de defesa constitutivo (Métraux *et al.* 2002; Durrant e Dong 2004), sendo efetiva contra fungos, bactérias, vírus, nematoides, plantas parasitas, e insetos herbívoros (Hammerschmidt e Kuc 1982; Sticher *et al.* 1997; Van Loon *et al.* 1998; Benhamou e Nicole 1999; McDowell e Dangl 2000; Walling 2000; Kessler e Baldwin 2002). Neste contexto, pode-se mencionar a rizobactéria *P. fluorescens* estirpe WCS417, a qual induz uma resposta imune sistêmica em *Arabidopsis* e é eficaz contra um amplo espectro de agentes patogênicos (resistência sistêmica induzida, ISR), mas os mecanismos que controlam este efeito não são bem compreendidos (Austim e Ballaré 2014).

É consenso que a indução de resistência mediada por rizobactérias ocorre pela ativação de genes envolvidos em diversos mecanismos de defesa. Estes envolvem a formação de papilas, halos, lignificação, camada de cortiça, formação de tiloses e decomposição de goma, além de compostos como fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (Pascholati e Leite 1995; Agrios 2005).

Embora os mecanismos ainda não estejam totalmente elucidados, algumas alterações fisiológicas na planta em resposta ao agente indutor podem evidenciar a ocorrência de indução de resistência, como o aumento da atividade de proteínas relacionadas à patogênese, como as peroxidases, quitinases, e β 1-3-glucanases. Araújo e Menezes (2009), avaliando, em casa-de-vegetação, a indução de resistência sistêmica a patógenos foliares em tomateiro (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, *Septoria lycopersici* Speg., *Alternaria solani* Sorauer e *Stemphylium solani* Weber), mediada por *Bacillus subtilis* (Ehrenberg, 1835) Cohn, 1872 e Acibenzolas-s-Metil, observaram o aumento significativo da concentração de peroxidases nas folhas das plantas tratadas com *B. subtilis*. Dessa forma, os pesquisadores sugeriram que o mecanismo de controle das doenças em questão está relacionado à resistência induzida.

2.4. Influência do biocarvão sobre a atividade de micro-organismos habitantes do solo

O biocarvão ou biochar é uma forma da matéria orgânica do solo (Benites *et al.* 2005), obtido pela carbonização parcial da biomassa vegetal (Lehmann e Joseph 2009; Maia *et al.* 2011) em ambiente anaeróbico, apresentando alta estabilidade no solo

(Trazzi 2014), elevado teor de compostos carbônicos aromáticos que pode variar de 35 a 80% (Lehmann e Joseph 2009), alta porosidade e tem como finalidade a aplicação no solo (Santos *et al.* 2013).

O biochar encontra-se presente nos solos de diversas regiões do mundo, o qual é depositado por meio de eventos naturais como a queima de florestas e pastagens (Skjemstad *et al.* 2002; Krull *et al.* 2008) e, conforme mencionado por O'Neill *et al.* (2009), relatos de seu uso datam pelo menos de 2000 anos. Conforme as características do biocarvão, as quais são dependentes do processo de carbonização, este pode atuar sobre as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, proporcionando aumento do pH, da capacidade de troca de cátions (Rondon *et al.* 2007; LIANG *et al.*, 2006) e da capacidade de retenção de nutrientes (Wardle *et al.* 1998), promovendo a melhoria da fertilidade e, conseqüentemente, proporcionando aumento de produtividade das culturas (Atkinson *et al.* 2010; Lehmann e Joseph 2009)

A atuação do biocarvão sobre as propriedades biológicas do solo está relacionada à capacidade deste composto de servir como abrigo físico para micro-organismos presentes no solo (Benites *et al.* 2005), devido a sua alta porosidade, resultando no aumento da atividade de micro-organismos benéficos no local de aplicação (Warnock *et al.* 2007). Além disso, outro mecanismo de atuação sobre as propriedades biológicas do solo é a liberação de compostos provenientes da pirólise, sendo mencionado, por Graber *et al.* (2010), que alcatrões residuais orgânicos, quando em baixas concentrações, possivelmente são capazes de promover o crescimento de populações de micro-organismos indígenas. Entretanto, sabe-se que estes compostos em altas concentrações apresentam efeitos tóxicos sobre as populações de micro-organismos do solo.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL:

Selecionar rizobactérias com potencial de promoção de crescimento e indução de resistência à *C. cassiicola* em tomateiro.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Analisar a influência do biocarvão sobre o número de bactérias totais do solo e avaliar a capacidade das mesmas em colonizar o sistema radicular de plântulas de tomateiro.
- Verificar o potencial de rizobactérias na promoção de crescimento de plântulas de tomateiro, produção de ácido indol acético e solubilização de fosfato e a influência do biocarvão sobre a seleção de bactérias com esse potencial.
- Verificar o potencial de rizobactérias na indução de resistência em tomateiro contra a mancha-alvo e a influência do biocarvão sobre a seleção de bactérias com esse potencial.
- Identificar os isolados mais promissores no *screening* de promoção de crescimento.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Localização da área de estudo

Os experimentos foram realizados no laboratório de Fitopatologia e na estação experimental de hortaliças Von der Pahlen (EEH) do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA, ambos localizados no município de Manaus, estado do Amazonas.

4.2. Avaliação *in vitro* da influência do biocarvão sobre a população bacteriana cultivável do solo

4.2.1. Contagem de bactérias totais

Para quantificar o número de bactérias totais (unidades formadoras de colônias – UFC), as amostras de solo foram coletadas na Estação Experimental de Fruticultura Tropical – EEFT/INPA, localizada na BR 174, (km 42), município de Manaus - AM, em uma área com parcelas (25 m²) constituídas por dosagens crescentes de biocarvão: 0 t ha⁻¹, 40 t ha⁻¹, 80 t ha⁻¹ e 120 t ha⁻¹. Em cada parcela com as respectivas doses de biocarvão, três amostras simples foram coletadas na profundidade de 0-10 cm, com auxílio de um trado de modo a obter uma amostra composta. Após a coleta, as amostras foram misturadas, resultando em uma amostra composta. Cerca de 300 g desta amostra foram acondicionadas em sacos plásticos e transportadas em caixa de poliestireno para o laboratório de Fitopatologia do INPA.

Importante mencionar que a aplicação do biocarvão se deu no ano de 2006. Três meses após adubação, iniciou a rotação de culturas entre milho e feijão-caupi e, em seguida, foi realizada em área total uma nova adubação química (66 kg ha⁻¹ de uréia, 177 kg ha⁻¹ de superfosfato triplo e 100 kg ha⁻¹ de KCl) à lanço.

Na tabela 1 são apresentados os atributos químicos dos resíduos de biocarvão incorporados ao solo, do qual foram retiradas as amostras para a realização desse trabalho.

Tabela 1. Atributos químicos do biocarvão incorporado ao solo em Manaus-AM, 2017.

Material	C	N	Ca	Mg	K	P	Zn	Mn
	-----g kg ⁻¹ -----						-----mg kg ⁻¹ -----	
Fino do carvão	873,26	8,93	6,22	1,30	2,08	0,16	12,00	67,00

*Padilha, 2017.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) com quatro tratamentos e cinco repetições. Os tratamentos foram representados pelas doses de biocarvão (0, 40, 80 e 120 t ha⁻¹) e cada repetição constituída por uma placa de Petri.

Para a realização do experimento foi utilizada a metodologia de diluição seriada, em que amostras de 1 g de solo não rizosférico foram diluídas em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina (0,85% NaCl) e agitadas por 30 min., com auxílio de um agitador magnético, obtendo-se a diluição em série de 10⁻¹ até o fator 10⁻⁴.

Após a diluição, foi realizada a etapa de isolamento das estirpes utilizando-se um meio de cultura não seletivo, o meio 523 (Kado e Heskett) sólido (sacarose 10 g, extrato de levedura 4 g, caseína ácida 8 g, sulfato de magnésio 0,3 g, fosfato de potássio dibásico K₂HPO₄ 2 g, ágar 10 g e 1000 mL de água destilada), proporcionando a obtenção de uma maior diversidade de estirpes diferentes.

Para obtenção das colônias foram retiradas alíquotas de 100 µL do fator de diluição 10⁻⁴, as quais foram depositadas em placas de Petri contendo meio de cultura, e espalhadas com auxílio de alça de Drigalsky. As placas foram mantidas em BOD a 28 °C por 24 horas, quando foi quantificado o número de bactérias totais. Os resultados das contagens foram expressos em UFC mL⁻¹ da amostra, levando-se em consideração a diluição empregada, utilizando-se a seguinte fórmula:

$R = a \times 10^b \text{ UFC mL}^{-1}$, onde R = resultado, a = média do número de colônias por repetição e b = expoente da diluição.

Os dados obtidos pela contagem de UFC's foram submetidos à análise de variância, sendo em seguida analisados por meio de regressão quadrática por ser a que melhor se ajustou aos dados. O programa utilizado para a análise estatística foi o Assistat 7.6 beta.

4.3. Obtenção e seleção dos isolados bacterianos

4.3.1. Obtenção dos isolados

Nesta etapa, 50 colônias foram selecionadas, aleatoriamente, a partir das placas referentes a cada um dos quatro tratamentos com biocarvão, totalizando 200 isolados. O isolamento das bactérias foi realizado utilizando-se o meio 523 (Kado e Heskett) sólido, o qual é um meio não seletivo. As placas foram incubadas em BOD a 28 °C, por

48 h. Em seguida, as colônias foram repicadas, para tubos de ensaio contendo os respectivos meios de cultura, mantidas a 28 °C por 48 h e, posteriormente, armazenadas em refrigerador a 4 °C para futuros estudos.

4.4. Avaliação da capacidade de colonização radicular

Os isolados utilizados nos testes de promoção de crescimento e indução de resistência em casa-de-vegetação foram selecionados avaliando-se *in vitro* a capacidade desses em colonizar o sistema radicular de plântulas de tomateiro.

Para a realização desta etapa, foram utilizados os 200 isolados previamente selecionados. Os isolados bacterianos foram cultivados em placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura utilizado para o isolamento (meio 523 Kado e Heskett) por um período de 24 h. Após o crescimento da colônia, foi obtida a suspensão adicionando-se 10 mL de solução salina (0,85%). Por diluição, as concentrações das suspensões foram ajustadas de acordo com a correlação entre a densidade ótica e número de UFC's para 0,2 Abs. (540 nm), o que corresponde a aproximadamente 10^8 UFC mL⁻¹.

Para a dispensa dos isolados bacterianos, sementes de tomateiro cultivar Santa Cruz Kada não tratadas foram desinfestadas, através da imersão, em etanol (50%) por dois minutos, NaCl (2%) por quatro minutos e lavadas em água esterilizada. O método utilizado foi o de microbiolização, sendo as sementes imersas durante 24 h em água, contendo células dos referidos isolados (10^8 UFC mL⁻¹). Também foi utilizado *B. cereus* (isolado UFV-101), por ser uma rizobactéria de comprovada colonização radicular (Romeiro *et al.* 2010), como auxílio na diferenciação dos isolados que irão ou não colonizar o sistema radicular.

Na observação da colonização radicular foi utilizado o método preconizado por Bringel (1997) e Miranda (1997). Para isso, após o período de imersão, as sementes foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio ágar-água (0,8%) e mantidas nestes por 15 dias. Em seguida, foi avaliada a colonização do sistema radicular, observando-se a presença de um halo ao redor da raiz. Cada isolado foi marcado como positivo ou negativo para a capacidade de colonização radicular. Para visualização da formação de biofilme bacteriano foi utilizada a metodologia de observação em microscópio de luz, sob aumento de 100x.

Para confirmação de que os isolados que colonizaram o sistema radicular eram os mesmos inoculados foi utilizada a metodologia de plaqueamento de raízes. Para isso,

as plântulas foram retiradas dos tubos de ensaio e transferidas em placas de Petri contendo meio 523 (Kado e Heskett). Assim, as bactérias foram visualizadas após seu crescimento no entorno das raízes isoladas e comparadas com o isolado original, por meio de coloração de gram e morfologia das colônias.

A partir dos dados obtidos no teste de colonização radicular, foi realizada a avaliação da distribuição dos isolados quanto a capacidade de colonização radicular em função da origem por meio do teste do χ^2 . A análise estatística foi realizada utilizando-se o software PAST versão 2.17c.

4.5. Avaliação da promoção de crescimento mediada por rizobactérias

A avaliação do potencial das rizobactérias em promover o crescimento de plântulas de tomateiro foi realizada em duas etapas distintas. Na primeira, foi realizada uma seleção preliminar com os 200 isolados que colonizaram o sistema radicular e, a etapa seguinte, consistiu do teste de confirmação com os isolados mais promissores.

Em ambas as etapas, os isolados bacterianos foram cultivados em placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura utilizado para o isolamento, meio 523 (Kado e Heskett), por um período de 24 a 48 h. Após o crescimento da colônia, foram adicionados 10 mL de solução salina (0,85%) para obtenção da suspensão bacteriana. Por diluição, as concentrações das suspensões foram ajustadas de acordo com a correlação entre a densidade ótica e número de UFC's para 0,2 Abs. (540 nm), o que corresponde a aproximadamente a 10^8 UFC mL⁻¹.

A dispensa das rizobactérias nas sementes foi realizada por microbiolização, sendo estas imersas por um período de 24 h em suspensão bacteriana, contendo os respectivos isolados. Logo após, as sementes foram colocadas para germinar em tubetes plásticos (280 g) contendo o substrato Tropstrato HT Hortaliças®, específico para produção de mudas de hortaliças em estado não estéril. Do início ao fim do experimento, as mudas foram irrigadas, por microaspersão, duas vezes ao dia.

O delineamento experimental utilizado, tanto no *screening* como no ensaio de confirmação foi inteiramente ao acaso (DIC) com cinco repetições por tratamento. Também foram inseridas, entre os tratamentos, duas testemunhas, uma com sementes microbiolizadas em água (controle negativo) e outra com a rizobactéria *B. cereus* (UFV-101) (controle positivo) para melhor comparação dos efeitos de promoção de

crescimento. Os tratamentos foram representados pelos rizobactérias selecionadas previamente na avaliação de colonização radicular.

No *screening* foram avaliadas as variáveis: comprimento não seria altura? da parte aérea (CPA), número de folhas (NF), diâmetro do colo (DC) e massa seca da parte aérea (MSPA). Enquanto no teste de confirmação foram avaliados: altura? da planta (AP), número de folhas (NF), diâmetro do colo (DC), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca do sistema radicular (MSSR) e massa seca total. As avaliações foram realizadas 20 dias após a semeadura (d.a.s.) em ambos os experimentos. A variável CPA foi avaliada por meio da medição desde o colo até a gema apical da plântula, utilizando régua milimetrada. O NF foi obtido pela contagem de todas as folhas verdadeiras completamente expandidas. O DC foi avaliado utilizando-se um paquímetro digital (Marca ZAAS). A MSPA e MSSR foram avaliadas por meio da secagem das plântulas em estufa a 65 °C por 48 h. Antes da secagem, a parte aérea foi separada do sistema radicular. Após a secagem, foi realizada a pesagem e posteriormente dividiu-se a massa seca total pelo número de plântulas, para obtenção da massa seca média.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e posteriormente as médias analisadas pelo teste de agrupamento de médias SKOTT-KNOTT ao nível de 5% de probabilidade utilizando o programa de análises estatísticas ASSISTAT 7.7 beta (Versão 2015). A partir dos dados obtidos foi calculado o índice de promoção de crescimento (IPC) para determinar em porcentagem o quanto um determinado isolado avaliado apresentou de ganho para cada variável, sendo utilizada a seguinte fórmula:

$$IPC = \frac{M1 - M_{test}}{M_{test}} \times 100$$

Onde:

M1= Média da variável avaliada em cada tratamento

Mtest= média da variável avaliada na testemunha

4.5.1. Avaliação *in vitro* dos mecanismos de ação envolvidos na promoção de crescimento

Foram realizados testes com os isolados bacterianos que apresentarem resultados positivos na avaliação da promoção de crescimento vegetal em casa-de-vegetação, para

verificar a capacidade de produzir metabólitos que podem estar associados à promoção do crescimento.

4.5.1.1. Produção de ácido indol acético (AIA)

Os isolados selecionados e a espécie *B. cereus* (UFV-101) foram cultivados em placas de Petri contendo o meio 523 (Kado e Heskett) sólido e após 24 h transferidos para tubos de ensaio contendo 5 mL do meio TS suplementado com Hidroxitriptofano (0,3 g de triptona; 0,1 g de peptona de soja; 1,6 g de NaCl; 0,2 g hidroxitriptofano; 200 mL água destilada) aminoácido semelhante ao L-triptofano produzido em cápsulas contendo 50 mg do 5-HTP. Após 24 h de crescimento em agitação a 130 rpm, o meio foi transferido para tubos do tipo Falcon com capacidade de 10 mL. O material foi centrifugado a 5.000 rpm por dez minutos.

O método utilizado para determinar a produção de AIA foi o colorimétrico conforme preconizado por Bric *et al.*, (1991). Para determinação foi utilizado o reagente de Salkowski (1 mL $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,5M; 50 ml HClO_4 35%). Após a centrifugação, foram retiradas alíquotas de 2 mL do sobrenadante, colocando-as em tubos de ensaio com 1 mL (2:1) do reagente. Os isolados foram incubados em BOD na ausência de luz por um período de 20 min para ocorrer à reação, pois a auxina é inativada ou destruída por foto-oxidação (PEIXOTO, 2011). A coloração avermelhada no tubo caracterizou a produção de AIA pela bactéria.

4.5.1.2. Solubilização de fosfato

Para avaliar a solubilização do fosfato foi utilizada a metodologia proposta por Katznelson e Bose (1959), que considera a capacidade dos isolados em solubilizar fosfato inorgânico na forma de CaHPO_4 .

A composição do meio de cultura utilizado foi: 1% de glicose, 2% de ágar, 0,2% de asparagina, 0,05% de MgSO_4 , 0,01% de NaCl, 0,01% de KCl e 0,05% de extrato de levedura para 1000 mL de água destilada. O meio foi esterilizado, retirado da autoclave e colocado em banho-maria. Depois de atingir 50 °C, foram adicionados 50 mL de solução esterilizada de K_2HPO_4 a 10% e 100 mL de solução esterilizada de CaCl_2 a 10% para produzir um fino precipitado de CaHPO_4 . A reação do meio foi então, ajustada para pH 7,0 com NaOH 1 N esterilizado e o meio vertido imediatamente em

placas de Petri. Foi cultivado um isolado por placa de Petri e a incubação foi realizada a 28 °C por quinze dias. Os isolados foram avaliados durante 15 dias. As colônias que formaram halo claro ao seu redor foram consideradas solubilizadoras de fosfatos. Foram medidos os diâmetros das colônias e dos halos de solubilização ao redor delas para obtenção do índice de solubilização (IS), por meio da fórmula: $IS = \phi \text{ Halo (mm)} / \phi \text{ Colônia (mm)}$. A partir dos índices de solubilização de cada isolado, as bactérias foram classificadas como rizobactérias com baixa ($IS < 2$), média ($2 \leq IS < 4$) e alta solubilização ($IS > 4$). De acordo com o início da solubilização, as bactérias foram classificadas ainda como precoces, cujo início da solubilização se deu até o terceiro dia; tardias, com início da solubilização depois do terceiro dia e não-solubilizadoras aparentes, aquelas que não apresentaram solubilização visível até o 15^o dia de avaliação (Hara e Oliveira, 2004).

4.6. Avaliação do potencial de indução de resistência a *Corynespora cassiicola*

O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação e para a obtenção da suspensão bacteriana, os isolados selecionados no teste de colonização radicular foram cultivados em placas de Petri, contendo o mesmo meio de cultura utilizado para o isolamento, meio 523 (Kado e Heskett) e mantidos em BOD a 28 °C. Após 24 h de crescimento, as bactérias foram removidas das placas, depositando 15 mL de solução salina (NaCl 0,85%) por placa, fazendo a raspagem com auxílio da alça de Drigalsky. Por diluição, as concentrações das suspensões foram ajustadas de acordo com a correlação entre a densidade ótica e número de UFC's para 0,2 Abs. (540 nm), o que corresponde a aproximadamente a 10^8 UFC mL⁻¹.

Para esse experimento foram utilizadas sementes de tomateiro cultivar Santa Cruz Kada. A dispensa das bactérias foi por microbiolização de sementes, sendo estas imersas por 24 h em suspensão bacteriana, contendo os respectivos isolados. Após esse período, foram semeadas em tubetes com capacidade de 280 g, contendo o substrato Tropstrato HT Hortaliças®, específico para produção de mudas de hortaliças em condições não estéreis.

O isolado de *C. cassiicola* utilizado nos experimentos foi o INPA 2839, pertencente à coleção de micro-organismos do INPA. O fungo foi cultivado em meio batata-dextrose-ágar (BDA) e no décimo dia de crescimento, coincidindo com o vigésimo dia de crescimento das plantas de tomateiro, foram preparadas as suspensões

de esporos com $1,1 \times 10^5$ esporos mL^{-1} . Com auxílio de um atomizador, foi inoculado o patógeno desafiante, por meio da aspersão da suspensão de esporos nas plantas, posteriormente as mudas foram submetidas a câmara úmida por 24 h.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), com 28 tratamentos e 10 repetições. Foram utilizadas três testemunhas, duas com sementes imersas em água, sendo que uma planta foi inoculada com o patógeno e a outra com água. A terceira testemunha constou de plantas inoculadas com *B. cereus* UFV-101 e pulverizadas com o patógeno. A avaliação foi realizada em dias alternados iniciando no segundo dia após a inoculação do patógeno até o décimo dia, quantificando-se a incidência e a severidade.

A incidência foi avaliada por meio da contagem do número de folhas infectadas, em três folhas compostas, situadas no terço inferior, médio e superior das plântulas de tomateiro. Enquanto que, a severidade foi quantificada através da escala de notas de Horsfall-Barratt adaptada (Oliveira *et al.* 2006). A avaliação pela escala foi realizada analisando três folíolos da planta, sendo atribuídas as notas: 0 – sem sintomas; 1 - < 1% de área lesionada; 2 – 1,1 a 3% de área lesionada; 3 – 3,1 a 6% de área lesionada; 4 - 6,1 a 12% de área lesionada; 5 – 12,1 a 25% de área lesionada; 6 – 25,1 a 50% de área lesionada; e 7 - >50% de área lesionada.

Na análise estatística da incidência e severidade, os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste de F e as diferenças entre as médias, comparadas pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de significância, utilizado o software ASSISTAT 7.7 beta.

A partir dos dados obtidos para severidade (escala de notas) foi calculada a Área Abaixo da Curva de Progresso de Doença (AACPD), sendo utilizada a fórmula: $\text{AACPD} = \sum ((Y_i + Y_{i+1}) / 2) (t_{i+1} - t_i)$, onde Y representa a intensidade da doença, t o tempo e i o número de avaliações no tempo (Campbell e Greaves, 1990).

Os dados fornecidos pela escala de notas foram utilizados para o cálculo da porcentagem de proteção da planta, a qual foi estimada pela relação: $(1-x/y)$, onde x representa AACPD das plantas tratadas e y, AACPD dos controles inoculados (Li *et al.* 1996).

4.7. Avaliação da influência da origem dos isolados sobre as variáveis avaliadas

Esta avaliação teve o intuito por à prova a hipótese de que a proporção de indivíduos com reação positiva nos testes de capacidade de colonização radicular, promoção de crescimento, produção de ácido indol acético, solubilização de fosfato e indução de resistência não difere significativamente nas 4 amostras contra a hipótese de que isso não é verdadeiro.

Avaliação da influência da origem dos isolados na seleção de bactérias capazes de colonizar o sistema radicular foi realizada por meio do teste do χ^2 . Enquanto para as demais variáveis (promoção de crescimento, produção de ácido indol acético, solubilização de fosfato e indução de resistência) foi utilizado o teste exato de Fisher. As análises estatísticas foram realizadas no programa PAST 2.17c.

4.8. Caracterização fenotípica das rizobactérias com potencial de promoção de crescimento

Os isolados foram cultivados no meio 523 e após 24 h caracterizados quanto a reação de Gram, cor da colônia, textura, forma, elevação, borda e tempo de crescimento. Posteriormente, a partir dos dados de caracterização morfológica foi construído o dendrograma de similaridade utilizando o índice de Bray-Curtis obtido pelo algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean). A análise foi realizada por meio do programa PAST versão 2.17c..

4.9. Identificação dos isolados

4.9.1. Extração de DNA bacteriano

O DNA genômico foi extraído pelo método fenol-clorofórmio adaptado de Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989).

Os isolados foram cultivados em meio LB líquido, por 24 h, até a turvação do meio, e centrifugados a 9700 g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 500 μ L de TE (10 mL de Tris – HCl 1M pH 7,5; 2 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0), seguido de centrifugação. O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado ressuscitado em 500 μ L de TE. Posteriormente, foi adicionado à suspensão 30 μ L de SDS 10% e 0,5 g de sílica, sendo então submetida à agitação em “Tissuelyser” por 30 segundos. Após a agitação, adicionou-se 500 μ L de

fenol saturado, logo em seguida a suspensão foi homogeneizada por inversão e centrifugada a 9700 g por 10 minutos. Em seguida, a fase superior foi transferida para um novo tubo e adicionados 200 μL de fenol e 200 μL de clorofórmio. Posteriormente, a suspensão foi homogeneizada por inversão e centrifugada a 9700 g por 5 minutos. Após essa etapa, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionando-se 10% do volume de NaCl 5 M e 60% do volume de Isopropanol frio ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Em seguida, a suspensão foi incubada por 5 min em temperatura ambiente e centrifugada a 9700 g a 10 min. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o DNA lavado com 400 μL de etanol 70% frio e centrifugado por 2 min a 9700 g. Por fim, o sobrenadante foi removido, o DNA seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 50 μL de TE. O DNA foi tratado com RNase ($10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) em banho-maria a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos.

A qualidade e concentração do DNA foram verificadas por espectrofotometria (NanoDrop® 1000) e em gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídio. A eletroforese foi realizada a 140 v/1 h. e o gel de agarose foi visualizado e fotografado no sistema de fotodocumentação (L-PIX CHEMI Molecular Imaging).

4.9.2. Reação de ERIC-PCR

Para a amplificação do DNA na Reação ERIC-PCR foi utilizado o par de “primers” ERIC1 “forward” (5’ - ATGTAAGCTCCTGGGGATTGAG - 3’) e ERIC2 “reverse” (5’ - AAGTAAGTGACTGGGGTGAGC - 3’) e o sistema da reação de PCR é apresentado na tabela 2.

Tabela 2. Sistema da reação de ERIC-PCR.

Reagentes	Estoque	Final/ PCR	Volume/ reação μL	Volume do Mix 27 μL
Água ultra-pura		Q.S.P	16,25	438,75
Tampão da enzima	10x	1x	2,5	67,5
dntps	10 mM	0,4	1	27
MgCl ₂	50 mM	2	1	27
Primer forward	5 pmol	0,2	1	27
Primer reverse	5 pmol	0,2	1	27
DNA molde	50 ng/ μL	4	2	54
TAQ DNA polimerase	5U/ μL	1,25	0,25	6,75
Total			25	675

Os produtos da PCR foram purificados com acetato de amônio 7,5 M e a concentração do DNA verificada em espectrofotômetro NanoDrop® 1000. A amplificação foi realizada em termociclador (Applied Biosystems Veriti 96-Well Thermal Cycler), sob as seguintes condições: desnaturação inicial a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5

minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 50 °C por 1 minuto e extensão a 65 °C por 8 minutos, com extensão final a 65 °C por 16 minutos. Após a amplificação, os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose brometo de etídio a 1,5 % com tampão TBE 0,5X (ph=8) com corrida a 140v/ 1 h, sendo o gel de agarose visualizado e fotografado no sistema de fotodocumentação (L-PIX CHEMI Molecular Imaging).

Os resultados provenientes da reação de ERIC-PCR de cada isolado foram analisados utilizando o Programa PAST® (versão 2.17c.), a partir da transformação binária dos dados e a construção de uma matriz 0-1, onde 1 indica a presença de banda e 0 a ausência. As bandas geradas para cada isolado foram comparadas e suas semelhanças estimadas pelo Coeficiente de Jaccard, o qual foi obtido pelo algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean) e os isolados foram agrupados e representados graficamente por meio de um dendograma de similaridade (Sneath e Sokal, 1973).

4.9.3. Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Para a amplificação do DNA na reação de PCR foram utilizados os *primers* P027 “*forward*” (5’ – GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3’) e 1492R “*reverse*” (5’ - ACGGTTACCTTGTTACGACTT – 3’). A purificação da PCR foi realizada pelo método Exosap adicionando-se 0,3 µL de exosap para 5 µL de produto de PCR. Em seguida, a mistura foi incubada em termociclador a 37 °C por 15 min (ativação) e 80 °C por 15 min (inativação). A reação de sequenciamento é apresentada na tabela 3.

Tabela 3. Reagentes e volumes utilizados nas reações de sequenciamento do gene 16S rRNA.

Reagentes	1 reação	12 reações
H ₂ O UP	2 µL	24 µL
Tampão Big Dye	1,5 µL	18 µL
Big Dye Terminator (v3.1)	0,5 µL	6 µL
Primer F ou R (3,2pmol)	1 µL	12 µL
Produto de PCR	5 µL	60 µL
Volume Final	10 µL	120 µL

A incubação foi realizada em termociclador (Applied Biosystems Veriti 96-Well Thermal Cycler) e as condições de amplificação são apresentadas na tabela 4.

Tabela 4. Condições de amplificação nas reações de sequenciamento do gene 16S rRNA.

Condições de amplificação	Ciclos	Sequenciamento	
		Temperatura (°C)	Tempo (min)
Desnaturação inicial	1x	96	1 min
Desnaturação	35x	96	15 seg
Anelamento	35x	50	15 seg
Extensão	1x	60	4 min
Extensão final	1x	10	∞

A purificação para precipitação das reações de sequenciamento foi conduzida em placa com 96 poços utilizando-se 10 µL de reação em cada poço. Inicialmente, a placa da reação de 96 poços foi removida do termociclador e centrifugada rapidamente (spin). Em seguida, adicionaram-se 5 µL de EDTA e 60 µL de etanol 100% em cada poço, a placa foi selada, coberta com papel alumínio, misturada com auxílio de um agitador tipo Vortex, incubada a temperatura ambiente por 15 min e centrifugada à 4°C, 3000 g x 30 min. Posteriormente, a placa foi invertida na centrífuga, centrifugada a 185 g x 20 seg, e retirada da centrífuga, sendo adicionados 60 µL de etanol 70% em cada poço, seguido de centrifugação à 4 °C, 1650 g x 15 min. Logo após, a placa foi invertida na centrífuga, centrifugada a 185g x 20 seg e retirada da centrífuga. Após a retirada, o álcool foi evaporado em termociclador a 95 °C por 3 min e as amostras ressuspendidas em 10 µL de tampão de injeção (HI-DI formamida), misturadas com auxílio de um agitador tipo Vortex por 3 seg e centrifugadas a 2000 g x 30 seg. Por fim, as amostras foram incubadas em termociclador a 95 °C por 3 min, colocadas imediatamente no gelo e levadas para sequenciamento em sequenciador MegaBACE (RSTECH).

4.9.4. Filogenia

A sequência de consenso foi obtida manualmente com base no sequenciamento das cadeias F e R e as novas seqüências geradas neste estudo foram depositadas no número de acesso do GenBank ([http:// www.ncbi.nlm.nih](http://www.ncbi.nlm.nih)) MH547253 à MH547275.

A construção do conjunto de dados foi feita com seqüências da região 16S rRNA das linhagens obtidas neste estudo e as seqüências obtidas do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih>) através da ferramenta BLASTn. As seqüências foram alinhadas

com o serviço online do MAFFT (Kato et al. 2017) e ajustadas manualmente no programa MEGA 7.0 (Tamura et al, 2013).

As análises filogenéticas foram realizadas pelos métodos de Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (IB). A deleção parcial foi utilizada para o tratamento das lacunas e os dados faltantes na análise de MV, assim como 95% de corte e bootstrap não paramétrico foram feitos com 1000 réplicas e a árvore foi gerada e visualizada no programa MEGA 7.0. A inferência bayesiana foi baseada no modelo selecionado por PAUP * 4 e Mrmodeltest2 v2 (Posada 2003) através de um alinhamento incluindo todos os locais. A análise corre por dez milhões de gerações, com os primeiros 25% de árvores descartadas como burnin usando a ferramenta MrBayes v. 3.6 disponível na plataforma CIPRES (<https://www.phylo.org/>). A probabilidade a posteriori (PP) e a topologia da árvore foram visualizadas com o Figtree v. 1.1.2 (Rambaut 2009).

4.9.5. Identidade de pares

A análise de identidade entre as seqüências foi realizada no programa SDT v.1.2 (ferramenta de demarcação de sequênciã) por meio de um arranjo contendo sequências das linhagens obtidas deste estudo e sequências obtidas do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih>) pela ferramenta BLASTn. O algoritmo de alinhamento MAFFT foi selecionado para calcular os valores de identidade e a similaridade das relações filogenéticas foi feita com o componente Neighbor usando dois valores de corte, um em 99% e outro em 78%. Estes limites representam limiares de demarcação de espécies

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. 1. Quantificação da influência do biocarvão sobre bactérias cultiváveis do solo

Quanto à influência do biocarvão sobre as bactérias cultiváveis, a análise de variância (ANOVA) revelou efeito significativo para a regressão, pelo teste F, dentre os tratamentos para o parâmetro unidades formadoras de colônias ($p < 0,0001$) (Tabela 5).

Tabela 5. Análise de variância para a regressão polinomial do efeito de doses crescentes de biocarvão sobre as unidades formadoras de colônias do solo (UFC).

ANOVA					
	gl	SQ	QM	F	<i>p</i>
Regressão	2	85,8324	42,9162	90,00**	<0,0001
Resíduo	17	8,1056	0,4768		
Total	19	93,938			

**significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

Se o biocarvão não for aplicado no solo (dose 0), o número de UFC estimada é de $6,65 \times 10^6$ UFC mL⁻¹. A dose ótima de biocarvão estimada pelo modelo de regressão ajustado é de 34 t ha⁻¹, proporcionando o valor máximo de $7,55 \times 10^6$ UFC mL⁻¹. O modelo de regressão ajustado ($\hat{y} = 6,656 + 0,0532x - 0,0008x^2$), sendo “ \hat{y} ” o valor estimado de UFC e “ x ” as doses de biocarvão, pode explicar que 91,37% da variação total de UFC é em função das doses de biocarvão.

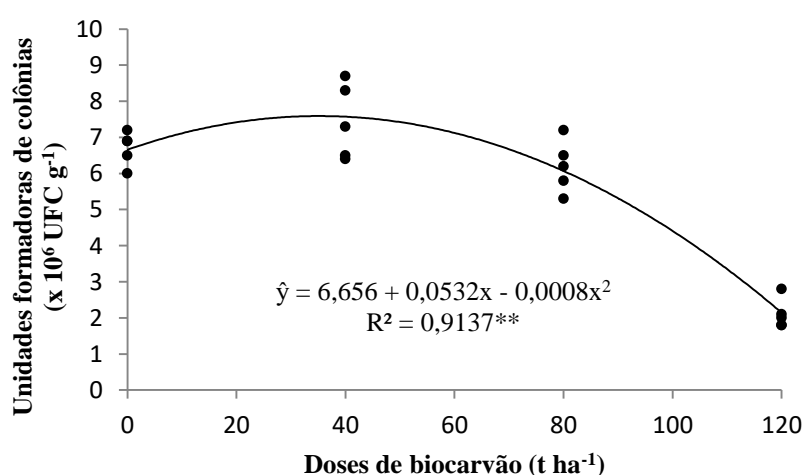


Figura 1. Relação entre doses de biocarvão e unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias cultiváveis do solo não rizosférico (0-10 cm). ** significativo ($p \leq 0,01$).

Os resultados obtidos nesse estudo indicam que o biocarvão estimula o crescimento bacteriano até a dose de 34 t ha⁻¹ e a partir desse ponto ótimo há decréscimo da população de bactérias cultiváveis do solo não rizosférico. Estudo realizado com biocarvão, em Cambissolo de textura argiloso arenosa, por Jones *et al.* (2012) também indicou respostas semelhantes às obtidas nesse trabalho, por parte das comunidades microbianas. Os autores utilizaram as doses de 0, 25 e 50 t ha⁻¹ e constataram que a partir do segundo ano do experimento aumentou o crescimento bacteriano no solo no qual foi incorporado biocarvão. Fato semelhante ocorreu quando Chen *et al.* (2013) avaliaram o efeito das doses de 0, 20 e 40 t ha⁻¹ de biocarvão produzido a partir de palha de trigo sobre a biomassa microbiana em solo arenoso, por meio da técnica de *fingerprints* de TRFLP do gene 16 S rRNA, verificaram alterações na abundância de T-RFs do solo com biocarvão quando comparado ao controle (solo sem biocarvão), indicando um estímulo no crescimento de determinadas populações de bactérias (índice de Shannon de 2,80 para solo sem biocarvão e 3,03 para solo com 40 t ha⁻¹ de biocarvão). Por outro lado, os resultados obtidos nesse trabalho diferem daqueles encontrados por Santos *et al.* (2013) que avaliando o efeito do biocarvão nas comunidades bacterianas, estrutura do solo e sistema radicular de soja (*Glycine max* L.), observaram através dos dados obtidos por T-RFLP e qPCR que a comunidade de bactérias do solo rizosférico foi menor do que as comunidades de bactérias do solo não-rizosférico, no entanto, no solo não-rizosférico não foi observado efeito do biocarvão.

Cabe destacar que a adição de biocarvão pode proporcionar tanto aumento de determinados grupos de micro-organismos como a diminuição de outros. Conforme observado por Kolton *et al.*, (2011), avaliando o efeito do biochar na composição das comunidades bacterianas associadas à raiz de plantas de pimentão (*Capsicum annuum* L.) por meio da técnica de *fingerprinting* de fragmentos do gene 16S rRNA, houve clara diferenciação entre as estruturas das comunidades associadas as raízes de plantas tratadas com biochar e plantas controle. A abundância relativa de membros do filo Bacteroides aumentou de 12 para 30%, como resultado da aplicação de biocarvão, enquanto a do Proteobacteria diminuiu de 71 para 47%. Entretanto, os autores, assim como em grande parte das pesquisas realizadas, não levaram em consideração a influência do biocarvão sobre os grupos bacterianos presentes no solo não rizosférico.

Vale salientar que a influência da aplicação de biocarvão nos solos pode variar significativamente, visto que as suas propriedades são muito diversas, dependendo da

qualidade e quantidade de biomassa e das condições da pirólise, além de haver uma heterogeneidade em nível de solos (Nóbrega 2011). Dessa forma, dependendo destas propriedades o biocarvão irá se comportar de forma diferente no solo liberando substâncias diversas que podem afetar negativamente os micro-organismos residentes. Spokas *et al.* (2010) mencionam que os produtos da pirólise da biomassa podem conter muitas substâncias tóxicas como dioxinas, furanos e fenóis, algumas das quais reduzem a atividade microbiana. Devido a isso, Durenkamp *et al.* (2010) sugerem que antes da utilização do biocarvão sejam realizados testes, pelo método da fumigação-extração, como forma de verificar seu impacto sobre a biomassa microbiana

Assim, pesquisas devem ser realizadas com intuito de verificar quais são essas substâncias tóxicas, por quanto tempo o biocarvão é capaz de liberá-las e qual a taxa de liberação, de forma a permitir o estabelecimento adequado do tipo de biocarvão e as doses a serem utilizados.

5.2. Avaliação da colonização radicular de plântulas de tomateiro por bactérias isoladas de solo com diferentes doses de biocarvão.

Na avaliação da colonização radicular dos 200 isolados testados *in vitro*, 70 (35%) foram positivos (Tabela 6). Esse resultado foi inferior ao obtido por Mafia *et al.* (2009) avaliando a colonização de raízes de clones híbridos de eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden x *E. urophylla* S.T. (Blake) por rizobactérias, visto que dos 50 isolados avaliados 30 (60%) foram capazes de colonizar o sistema radicular. Vale ressaltar que apesar da porcentagem de colonização ter sido menor em relação ao trabalho citado, houve um alto índice de colonização, pois os isolados obtidos nesse trabalho foram provenientes da camada de 0-10 cm e não da rizosfera da espécie avaliada. Nesse sentido, os resultados obtidos nesse trabalho são semelhantes àqueles obtidos por Andrade e Caniato (2017) sendo que 40% dos isolados avaliados oriundos de raízes de plantas de couve, berinjela e tomate foram capazes de colonizar o sistema radicular de plântulas de tomateiro.

Tabela 6. Capacidade de colonização radicular *in vitro* de 200 isolados bacterianos em plântulas de tomateiro, cultivar Santa Cruz Kada em Manaus (AM), 2017.

Isolado	Col.*	Isolado	Col.*	Isolado	Col.*	Isolado	Col.*
ISO1T1	-	ISO1T2	+	ISO1T3	-	ISO1T4	-
ISO2T1	-	ISO2T2	+	ISO2T3	-	ISO2T4	-
ISO3T1	+	ISO3T2	+	ISO3T3	-	ISO3T4	+
ISO4T1	+	ISO4T2	+	ISO4T3	-	ISO4T4	+
ISO5T1	-	ISO5T2	-	ISO5T3	-	ISO5T4	-
ISO6T1	+	ISO6T2	+	ISO6T3	+	ISO6T4	-
ISO7T1	+	ISO7T2	-	ISO7T3	-	ISO7T4	-
ISO8T1	+	ISO8T2	+	ISO8T3	+	ISO8T4	-
ISO9T1	-	ISO9T2	+	ISO9T3	-	ISO9T4	-
ISO10T1	+	ISO10T2	-	ISO10T3	-	ISO10T4	-
ISO11T1	-	ISO11T2	-	ISO11T3	-	ISO11T4	-
ISO12T1	+	ISO12T2	-	ISO12T3	-	ISO12T4	+
ISO13T1	-	ISO13T2	-	ISO13T3	+	ISO13T4	-
ISO14T1	+	ISO14T2	+	ISO14T3	-	ISO14T4	+
ISO15T1	-	ISO15T2	+	ISO15T3	+	ISO15T4	+
ISO16T1	-	ISO16T2	-	ISO16T3	-	ISO16T4	-
ISO17T1	-	ISO17T2	+	ISO17T3	+	ISO17T4	-
ISO18T1	-	ISO18T2	+	ISO18T3	-	ISO18T4	-
ISO19T1	-	ISO19T2	-	ISO19T3	-	ISO19T4	-
ISO20T1	-	ISO20T2	-	ISO20T3	-	ISO20T4	-
ISO21T1	-	ISO21T2	-	ISO21T3	-	ISO21T4	-
ISO22T1	+	ISO22T2	-	ISO22T3	+	ISO22T4	-
ISO23T1	-	ISO23T2	-	ISO23T3	+	ISO23T4	+
ISO24T1	-	ISO24T2	-	ISO24T3	-	ISO24T4	-
ISO25T1	-	ISO25T2	-	ISO25T3	-	ISO25T4	+
ISO26T1	-	ISO26T2	-	ISO26T3	-	ISO26T4	-
ISO27T1	+	ISO27T2	+	ISO27T3	-	ISO27T4	-
ISO28T1	+	ISO28T2	+	ISO28T3	-	ISO28T4	-
ISO29T1	-	ISO29T2	+	ISO29T3	-	ISO29T4	-
ISO30T1	-	ISO30T2	+	ISO30T3	-	ISO30T4	-
ISO31T1	-	ISO31T2	+	ISO31T3	-	ISO31T4	-
ISO32T1	-	ISO32T2	-	ISO32T3	-	ISO32T4	-
ISO33T1	-	ISO33T2	-	ISO33T3	-	ISO33T4	-
ISO34T1	+	ISO34T2	+	ISO34T3	+	ISO34T4	-
ISO35T1	-	ISO35T2	-	ISO35T3	-	ISO35T4	+
ISO36T1	-	ISO36T2	-	ISO36T3	-	ISO36T4	-
ISO37T1	-	ISO37T2	-	ISO37T3	-	ISO37T4	-
ISO41T1	+	ISO38T2	+	ISO38T3	-	ISO38T4	-
ISO46T1	+	ISO39T2	+	ISO39T3	-	ISO39T4	-
ISO47T1	+	ISO40T2	+	ISO40T3	-	ISO40T4	-
ISO51T1	+	ISO41T2	+	ISO41T3	-	ISO41T4	-
ISO52T1	+	ISO42T2	-	ISO42T3	-	ISO42T4	-
ISO53T1	+	ISO43T2	-	ISO43T3	-	ISO43T4	-
ISO102T1	+	ISO45T2	+	ISO44T3	-	ISO44T4	-
ISO108T1	+	ISO52T2	+	ISO45T3	-	ISO45T4	-
ISO109T1	+	ISO63T2	+	ISO46T3	-	ISO46T4	-
ISO113T1	+	ISO72T2	+	ISO47T3	-	ISO47T4	-
ISO114T1	+	ISO79T2	+	ISO48T3	-	ISO48T4	-
ISO115T1	+	ISO80T2	+	ISO49T3	-	ISO49T4	-
ISO117T1	+	ISO85T2	+	ISO62T3	+	ISO50T4	-

*Col.= colonização.

Através dos dados obtidos para os 200 isolados avaliados no teste de colonização radicular, para frequência absoluta e relativa, observa-se maior número

isolados capazes de colonizar o sistema radicular, provenientes das áreas com as doses de 0 e 40 t ha⁻¹ de biocarvão. Ao se comparar a distribuição dos isolados quanto à colonização radicular, em relação à origem, o teste χ^2 , mostrou haver influência dos tratamentos com biocarvão sobre a proporção de isolados bacterianos capazes de colonizar o sistema radicular de plântulas de tomateiro (Tabela 7).

Esses dados, juntamente com as informações obtidas pela contagem de UFC, sugerem que o biocarvão, em doses elevadas, além de reduzir a população de bactérias cultiváveis do solo não rizosférico, interfere negativamente na sobrevivência de grupos específicos de bactérias capazes de colonizar ativamente a rizosfera de plântulas de tomateiro. Cabe destacar que, por ser tratar de um estudo pioneiro, não foram encontrados na literatura trabalhos sobre a interação entre o biocarvão e grupos específicos de bactérias aptas a colonizar o sistema radicular de tomateiro.

Tabela 7. Distribuição de frequência do resultado do teste de colonização radicular de 200 isolados bacterianos, segundo a origem em Manaus (AM), 2017.

Doses de biocarvão (t ha ⁻¹)	Promoção de crescimento				Total
	Positivo		Negativo		
	N	%	N	%	
0	25	50	25	50	50 (25%)
40	28	56	22	44	50 (25%)
80	9	18	41	82	50 (25%)
120	8	16	42	84	50 (25%)
Total	70	35	130	65	200 (100%)

Estatística: $\chi^2 = 28,92$; $p < 0,0001$.

Diversos são os métodos utilizados para se comprovar a colonização radicular, entre eles imunofluorescência e uso de mutantes resistentes a antibióticos. Nesse trabalho, os três métodos utilizados para confirmação da colonização radicular se mostraram eficientes e a baixo custo.

O método de confirmação em tubos de ensaio contendo ágar-água (0,8%) por meio da visualização de zonas de turbidez possibilitou observar claramente a formação de névoa esbranquiçada ao redor do colo e do sistema radicular das plântulas de tomateiro (Figura 2). Conforme mencionado por Sottero *et al.* (2006), bactérias que colonizam somente o colo provavelmente necessitam de mais oxigênio e se estabelecem na superfície onde há maior disponibilidade desse elemento.

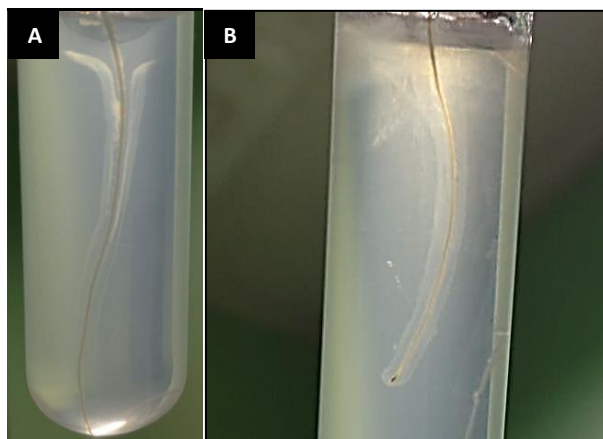


Figura 2 – Método de observação, por zonas de turbidez, da colonização radicular de plântulas de tomateiro em agar-água (0,8%). A) Colonização parcial e B) Colonização total da raiz.

Cabe mencionar, que pelo fato do meio utilizado não possuir nenhuma fonte de nutrientes, as bactérias que colonizaram o sistema radicular foram capazes de utilizar os exsudatos radiculares, secreções, mucilagem e/ou mucigel como fontes energéticas possibilitando seu desenvolvimento. Pelzer (2010) menciona que a habilidade de uma rizobactéria em colonizar raízes suprindo-se somente dos exsudatos radiculares constitui uma vantagem, por permitir o estabelecimento de uma associação planta-rizobactéria desde a emissão da radícula.

A visualização em microscópio de luz apresentou a vantagem de permitir confirmar a colonização em todos os isolados avaliados, além de possibilitar a visualização da formação do biofilme bacteriano, o qual conforme mencionado por (Danhorn e Fuqua 2007) tem a função de proteger as bactérias, além de favorecer a manutenção da densidade populacional requerida para o início de interações planta-bactéria.

As bactérias apresentaram padrões de colonização radicular distintos durante a formação do biofilme (Figura 3). Algumas, como o isolado ISO6T2, colonizam o sistema radicular de forma praticamente homogênea em toda sua extensão. Enquanto outras, como o isolado ISO4T1, colonizam mais intensamente regiões específicas (coifa e/ ou zona de crescimento), provavelmente por serem zonas que apresentam maior liberação de exsudatos radiculares e/ ou descamação celular.

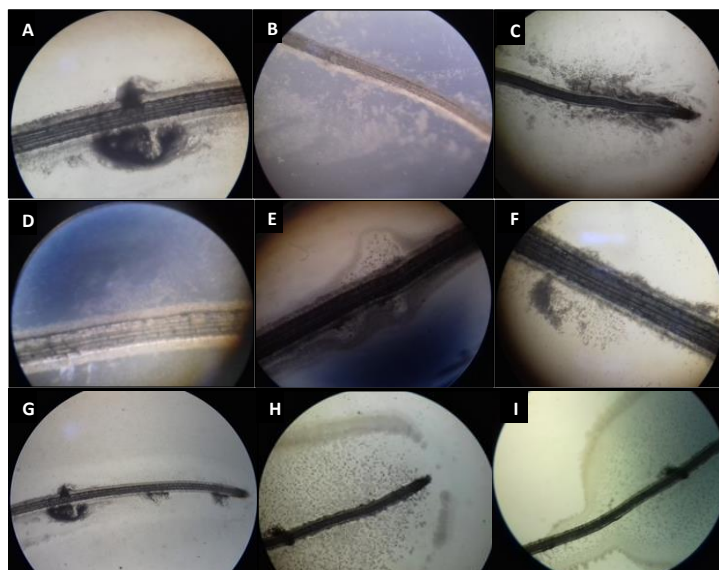


Figura 3. A – I. Formação de biofilme em raízes de plântulas de tomateiro (*S. lycopersicum*). Visualização em microscópio óptico (aumento x 100).

A metodologia de plaqueamento de raízes em placas de Petri mostrou-se eficiente e de fácil execução. Dessa forma, pôde-se observar claramente o crescimento bacteriano ao redor do sistema radicular (Figura 3). Da mesma forma, Silva (2011) utilizando a metodologia de plaqueamento das raízes constatou a colonização de todas as raízes, sob luz com comprimento de onda visível.

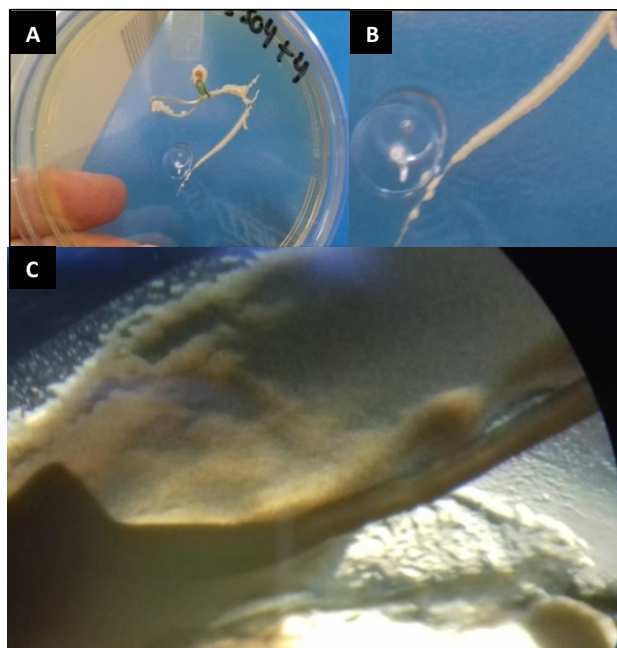


Figura 4. Colonização radicular de plântulas de tomateiro cultivar Santa Cruz Kada pelo ISO4T4 (A); Detalhe da colonização radicular (B); e Visualização da colonização radicular em microscópio estereoscópio (C).

5.3. Avaliação da promoção de crescimento de mudas de tomateiro em casa-de-vegetação

5.3.1. *Screening* dos isolados bacterianos

Dos 70 isolados positivos no teste de colonização radicular, somente 53 foram utilizados no *screening*, pois os demais não apresentaram crescimento satisfatório e foram descartados. Entre os 53 isolados avaliados, 28 (52,83%) apresentaram efeitos positivos sobre o crescimento das plântulas de tomateiro em pelo menos uma das variáveis analisadas. Os isolados ISO30T2, ISO80T2, ISO7T1, ISO22T3, ISO52T1, ISO8T2, ISO51T1, ISO46T1, ISO115T1, ISO12T4, apresentaram diferenças significativas, quando comparados à testemunha, proporcionando incrementos para todas as variáveis avaliadas (Tabela 9).

Quanto à variável AP, 26 isolados (49,05%) foram capazes de proporcionar incrementos significativos quando comparados à testemunha. As médias entre os isolados que proporcionaram resultados positivos para essa variável variaram entre 12,53 e 15,70 cm, enquanto para testemunha a média foi de 11,63 cm.

Conforme dados obtidos para o diâmetro do caule, 18 isolados (33,96%) propiciaram incrementos para essa variável, diferindo significativamente do tratamento controle, com médias variando entre 2,22 e 2,74 mm, enquanto a testemunha apresentou o valor de 1,97 mm.

Número de folhas foi a variável que menos mostrou diferenças entre os tratamentos, sendo que apenas 11 isolados (20,75%) diferiram estatisticamente da testemunha e incrementaram o número de folhas. Estes isolados apresentaram médias entre 3,33 e 4,33 folhas enquanto a testemunha apenas 2 folhas por planta.

Em relação à massa seca da parte aérea 24 isolados (45,28%) apresentaram diferenças significativas em relação a testemunha. Entre os isolados capazes de promover incrementos para essa variável as médias apresentaram valores entre 0,085 e 0,130 g e para a testemunha a média foi de 0,053 g.

Entre todos isolados utilizados no *screening*, apenas 8 (4%) apresentaram efeitos deletérios sobre o crescimento das plântulas de tomateiro promovendo a redução do crescimento da parte aérea. Além disso, 19 isolados (35,84%) foram neutros não apresentando diferenças significativas em relação ao tratamento controle para todas as variáveis analisadas (Tabela 8). Conforme mencionado por Dobbelaere *et al.* (2003) e Chanway *et al.* (1991), as bactérias podem apresentar efeito benéfico, neutro ou deletério, assim como observado nesse trabalho.

Tabela 8. Efeito de 53 isolados bacterianos na promoção de crescimento de mudas de tomateiro aos 20 dias após a semeadura no substrato Vivatto Plus®.

Tratamentos	AP (cm) ¹	DC (mm) ¹	NF ²	MSPA (g) ¹
Controle	11,63 b	1,97 b	2,00 d	0,230 (0,053) b
<i>Bacillus cereus</i>	11,20 b	1,85 b	2,33 cd	0,203 (0,041) b
ISO6T3	14,90 a	2,48 a	3,00 abcd	0,349 (0,122) a
ISO6T2	10,36 c	1,91 b	2,66 cd	0,231 (0,054) b
ISO62T3	11,83 b	2,08 b	2,66 bcd	0,275 (0,077) b
ISO72T2	11,50 b	2,05 b	2,33 cd	0,247 (0,062) b
ISO34T1	11,40 b	1,93 b	3,33 abc	0,254 (0,065) b
ISO109T1	10,76 b	1,94 b	2,33 cd	0,211 (0,046) b
ISO117T1	13,10 a	2,03 b	2,66 cd	0,296 (0,088) a
ISO3T4	13,80 a	2,10 b	3,66 abc	0,276 (0,086) b
ISO28T1	11,66 b	2,08 b	3,33 abcd	0,271 (0,073) b
ISO30T2	14,53 a	2,51 a	4,66 a	0,345 (0,119) a
ISO47T1	14,03 a	2,40 a	3,00abcd	0,317 (0,101) a
ISO80T2	14,00 a	2,48 a	3,66 abc	0,327 (0,107) a
ISO10T1	11,80 b	1,93 b	2,66 bcd	0,258 (0,067) b
ISO28T2	14,06 a	2,36 a	3,00 abcd	0,337 (0,114) a
ISO46T1	14,33 a	2,27 a	3,33 abc	0,326 (0,107) a
ISO1T2	10,30 c	1,59 b	2,00 d	0,220 (0,049) b
ISO4T2	13,13 a	2,16 b	2,00 d	0,302 (0,091) a
ISO4T4	10,16 c	1,71 b	2,00 d	0,237 (0,057) b
ISO8T1	10,13 c	1,89 b	3,00 abcd	0,221 (0,051) b
ISO85T2	11,56 b	2,06 b	3,00 abcd	0,263 (0,069) b
ISO2T2	13,60 a	2,56 a	3,00 abcd	0,341 (0,117) a
ISO41T1	11,56 b	1,90 b	2,33 cd	0,272 (0,076) b
ISO79T2	11,36 b	1,88 b	2,33 cd	0,254 (0,066) b
ISO8T2	13,56 a	2,22 a	3,66 abc	0,317 (0,101) a
ISO115T1	14,57 a	2,33 a	3,66 abc	0,326 (0,107) a
ISO12T4	14,73 a	2,57 a	3,33 abc	0,356 (0,127) a
ISO8T3	12,10 b	1,92 b	3,00 abcd	0,257 (0,066) b
ISO12T1	11,27 b	1,92 b	2,33 cd	0,226 (0,053) b
ISO6T1	12,93 a	2,11 b	3,00 abcd	0,292 (0,086) a
ISO15T4	10,33 c	1,73 b	2,00 d	0,223 (0,053) b
ISO15T2	13,00 a	1,63 b	3,00 abcd	0,291 (0,085) a
ISO15T3	7,73 d	1,15 b	2,33 cd	0,155 (0,024) b
ISO13T3	11,53 b	2,01 b	2,00 d	0,251 (0,065) b
ISO7T1	12,90 a	2,37 a	3,33 abc	0,306 (0,095) a
ISO52T2	13,20 a	2,49 a	2,66 bcd	0,322 (0,104) a
ISO35T4	12,96 a	1,71 b	2,00 d	0,265 (0,071) b
ISO25T4	13,16 a	1,90 b	2,33 cd	0,295 (0,089) a
ISO22T3	15,70 a	2,74 a	3,66 abc	0,331 (0,111) a
ISO53T1	15,10 a	2,13 b	2,00 d	0,305 (0,093) a
ISO23T3	13,93 a	2,45 a	2,33 cd	0,336 (0,114) a
ISO52T1	13,56 a	2,37 a	4,33 ab	0,340 (0,116) a
ISO22T1	8,60 d	1,48 b	2,33 cd	0,203 (0,042) b
ISO102T1	11,53 b	2,15 b	2,66 cd	0,268 (0,073) b
ISO14T1	10,86 b	1,71 b	2,00 d	0,245 (0,063) b
ISO27T1	11,76 b	2,13 b	2,00 d	0,256 (0,066) b
ISO108T1	10,96 b	2,43 a	3,00 abcd	0,245 (0,060) b
ISO114T1	13,93 a	2,45 a	3,00 abcd	0,335 (0,115) a
ISO17T3	14,53 a	2,66 a	2,33 cd	0,360 (0,130) a
ISO17T2	10,96 b	1,95 b	2,00 d	0,268 (0,072) b
ISO51T1	11,36 b	1,96 b	3,33 abc	0,245 (0,060) b
ISO39T2	10,13 c	1,94 b	2,33 cd	0,232 (0,054) b
ISO63T2	11,50 b	2,12 b	2,66 cd	0,255 (0,065) b
ISO113T1	12,56 a	2,39 a	3,00 abcd	0,292 (0,085) a

Tratamentos	AP (cm) ¹	DC (mm) ¹	NF ²	(continuação)
				MSPA (g) ¹
CV%	8,90	16,17	-	14,54

Média de cinco repetições. ¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$). ²Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Dunn ($p \leq 0,05$).

Em relação a AP, quando observados os ganhos percentuais proporcionados pelos isolados bacterianos avaliados, os isolados 6T3, 15T1, 12T4, 22T3 e 53T1 identificados como pertencentes ao grupo *B. cereus sensu lato* se destacaram, proporcionando incrementos superiores a 25%. Os demais isolados promoveram ganhos entre 7,99 e 24,93% (Figura 5). Batista *et al.* (2010), avaliando o potencial de actinomicetos na promoção de crescimento de plântulas de diferentes cultivares de tomateiro, obtiveram resultados positivos para altura das plantas independente da cultivar, sendo que o isolado I4 (*Streptomyces* sp.) promoveu ganhos médios superiores aos obtidos nesse trabalho, 48,82% no cultivar TROPIC (Grupo Salada - GS, lote 12158, origem Chile) e 41,07% no híbrido Ataque (Grupo Santa Cruz - GSC, lote 318456, origem USA).

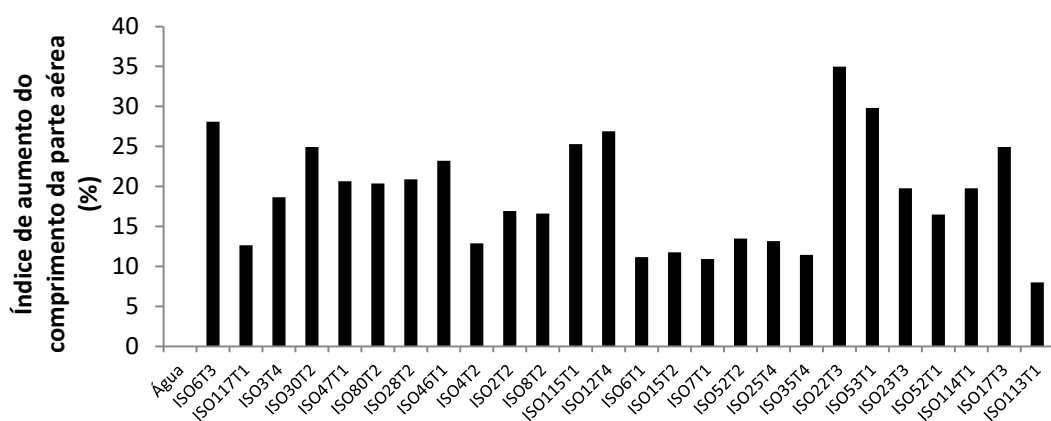


Figura 5. Ganhos percentuais relativos à 26 isolados de rizobactérias comparados com o tratamento em água (Controle) para a variável comprimento da parte aérea (CPA Tratamento controle considerado com índice de aumento igual a 0).

Quanto o diâmetro do caule, quando observados os ganhos percentuais proporcionado pelos isolados bacterianos avaliados, oito isolados proporcionaram ganhos entre 25,88% e 39,08%, sendo o isolado ISO22T3 (grupo *B. cereus*) o que

apresentou maior valor. Os demais isolados apresentaram ganhos entre 12,69% e 24,36% (Figura 6).

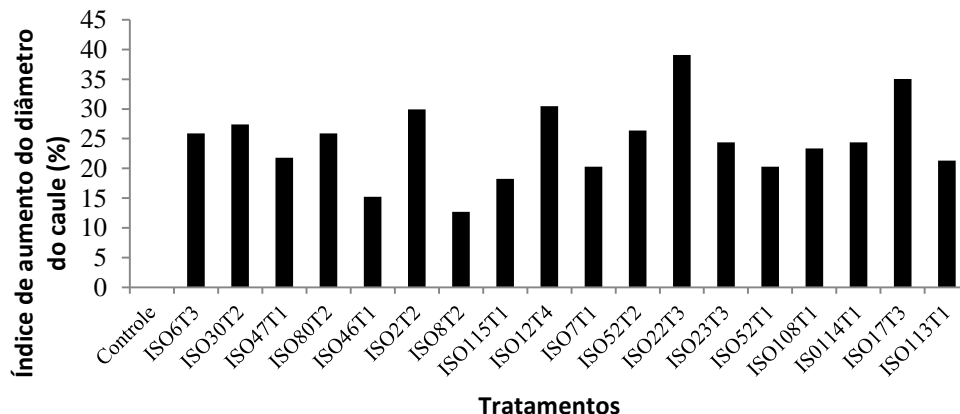


Figura 6. Ganhos percentuais relativos à 18 isolados de rizobactérias comparados com o tratamento em água (Controle) para o diâmetro do caule aéreo (DC). Tratamento controle considerado com índice de aumento igual a 0.

A partir dos resultados obtidos em relação aos ganhos percentuais para o número de folhas pode-se observar que o isolado ISO52T1 (grupo *B. cereus*) se destacou entre os isolados que influenciaram positivamente essa variável, com incremento superior a 100% (Figura 7). Costa (2012) avaliou a promoção de crescimento, em tomateiro, mediada por 14 isolados de rizobactérias e obteve incrementos entre 10,15% e 20,61% para o número de folhas, sendo esses valores bastante inferiores ao logrado pelo isolado ISO52T1.

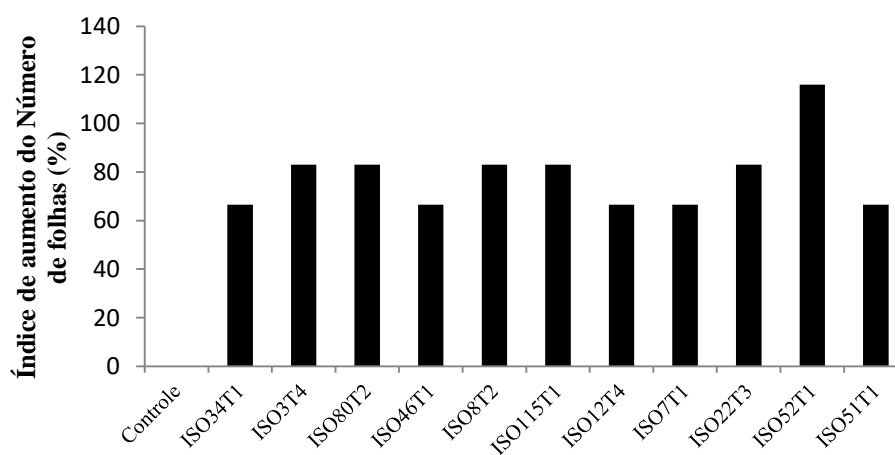


Figura 7. Ganhos percentuais relativos à 11 isolados de rizobactérias comparados com o tratamento em água (controle) para o número de folhas (NF). Tratamento controle considerado com índice de aumento igual a 0.

Quanto à variável massa seca da parte aérea, quando observados os ganhos percentuais proporcionados pelos isolados bacterianos avaliados, verificou-se que 13 isolados se destacaram, proporcionando aumentos entre 101,88% e 145,28% em relação ao controle. Os demais isolados apresentaram incrementos entre 60,37% e 96,22% (Figura 8). Pelzer *et al.* (2010) obtiveram aumentos inferiores quando investigaram a influência de rizobactérias sobre o crescimento de mudas de tomateiro, sendo que o isolado RR31223 apresentou o maior índice de aumento (37,71%) para a massa seca da parte aérea.

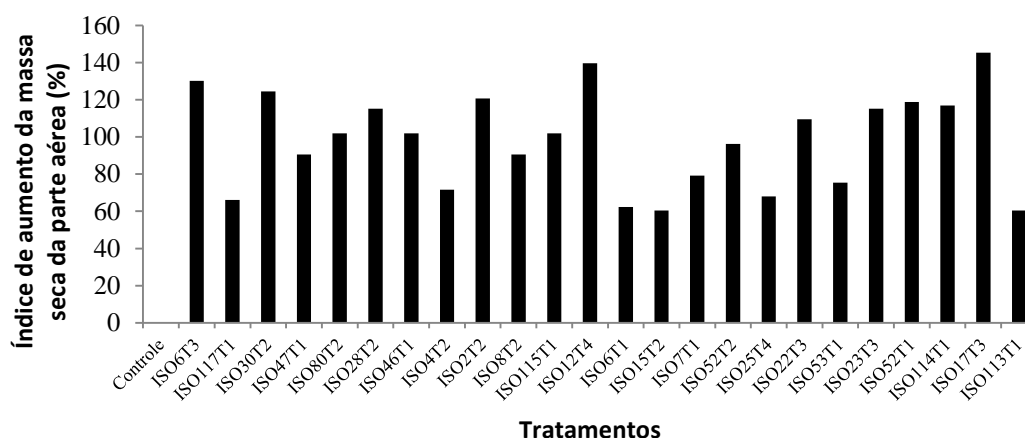


Figura 8. Ganhos percentuais relativos à 24 isolados de rizobactérias comparados com o tratamento em água (controle) para a variável massa seca da parte aérea (MSPA). Tratamento controle considerado com índice de aumento igual a 0.

Ao se comparar a distribuição dos isolados, o teste exato de Fisher mostrou não haver relação entre origem e capacidade de promoção de crescimento (Tabela 9). Portanto, os isolados pertencentes às 4 áreas de coleta (0, 40, 80 e 120 t ha⁻¹) se comportaram do mesmo modo ao teste de promoção de crescimento não havendo influência das diferentes doses de biocarvão sobre o resultado.

Esses dados sugerem que o biocarvão, em altas doses, apesar de reduzir a população bacteriana cultivável do solo não rizosférico e de bactérias capazes de colonizar ativamente o sistema radicular, não interfere negativamente sobre grupos específicos de bactérias capazes de promover o crescimento de plântulas de tomateiro.

Tabela 9. Distribuição de frequência dos isolados referente ao teste de confirmação da promoção de crescimento de 25 isolados bacterianos, segundo a origem em Manaus (AM), 2017.

Doses da biocarvão (t ha ⁻¹)	Promoção de crescimento				Total
	Positivo		Negativo		
	N	%	N	%	
0	10	43,47	13	56,53	23 (43,40%)
40	8	50	8	50	16 (30,19%)
80	4	50	4	50	8 (15,09%)
120	3	50	3	50	6 (11,32%)
Total	25	47,16	28	52,84	53 (100%)

Estatística: *p* valor (Fisher) = 0,97604^{ns}.

5.3.1.1. Caracterização e distribuição fenotípica das rizobactérias com potencial de promoção de crescimento

Os 25 isolados positivos no *screening* de promoção de crescimento foram caracterizados morfológicamente e os dados obtidos são apresentados na tabela 10.

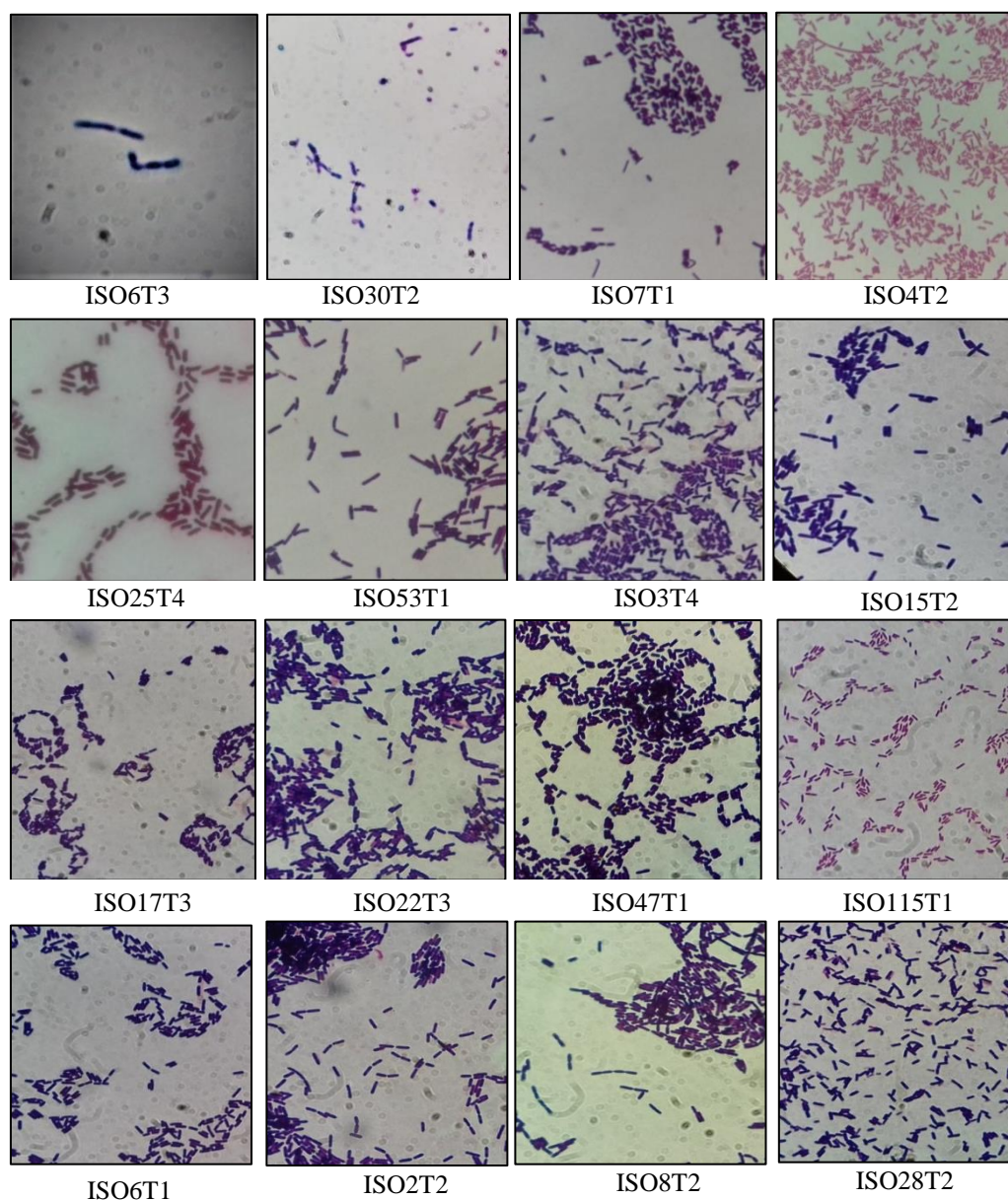
Tabela 10. Caracterização dos 25 isolados que apresentaram resultados positivos no teste preliminar de promoção de crescimento.

Isolados	Gram	Forma da bactéria	Forma da colônia	Borda	Elevação	Cor	Crescimento (h)
ISO6T3	+	bastonete	irregular	ondulada	plana	creme	24
ISO117T1	+	bastonete	irregular	ondulada	plana	creme	24
ISO3T4	+	bastonete	puntiforme	inteira	convexa	creme	24
ISO30T2	+	bastonete	circular	inteira	plana	creme	24
ISO47T1	+	bastonete	irregular	ondulada	plana	creme	24
ISO80T2	+	bastonete	irregular	ondulada	plana	creme	24
ISO28T2	+	bastonete	irregular	ondulada	plana	creme	24
ISO46T1	+	bastonete	puntiforme	inteira	convexa	creme	24
ISO4T2	-	bastonete	puntiforme	inteira	convexa	creme	24
ISO2T2	+	bastonete	filamentosa	filamentosa	plana	creme	24
ISO8T2	+	bastonete	filamentosa	filamentosa	plana	creme	24
ISO115T1	-	bastonete	puntiforme	inteira	convexa	creme	24
ISO12T4	-	bastonete	circular	inteira	papilada	amarela	24
ISO6T1	+	bastonete	irregular	ondulada	convexa	creme	24
ISO15T2	+	bastonete	irregular	ondulada	plana	creme	24
ISO7T1	+	bastonete	circular	inteira	plana	creme	24
ISO25T4	-	bastonete	circular	inteira	papilada	amarela	24
ISO22T3	+	bastonete	irregular	ondulada	plana	creme	24
ISO53T1	+	bastonete	irregular	ondulada	plana	creme	24
ISO23T3	+	bastonete	circular	inteira	plana	creme	24
ISO52T1	+	bastonete	circular	ondulada	plana	creme	24
ISO114T1	+	bastonete	puntiforme	inteira	convexa	creme	24
ISO17T3	+	bastonete	irregular	ondulada	plana	creme	24
ISO113T1	+	bastonete	irregular	ondulada	plana	creme	24
ISO52T2	+	bastonete	filamentosa	filamentosa	plana	creme	24

A partir dos resultados obtidos pela coloração de Gram pode-se observar que dos 25 isolados, 84% foram caracterizados como gram-positivos e 16% como gram-

negativos. Dentre os isolados gram-negativos, estão incluídos o 4T2 (*Lysinibacillus* sp.), 115T1 (*Lysinibacillus* sp.), e 25T4 (*Bacillus* sp.). Ambos os gêneros são gram-positivos, mas podem se apresentar como gram-negativos, quando se trata de culturas jovens em fase de esporulação. Em relação à forma das células vegetativas, todos os isolados apresentaram-se como bastonetes.

Na figura 9 é possível visualizar a forma e coloração de cada um dos 25 isolados positivos no teste de promoção de crescimento submetidos à coloração de Gram.



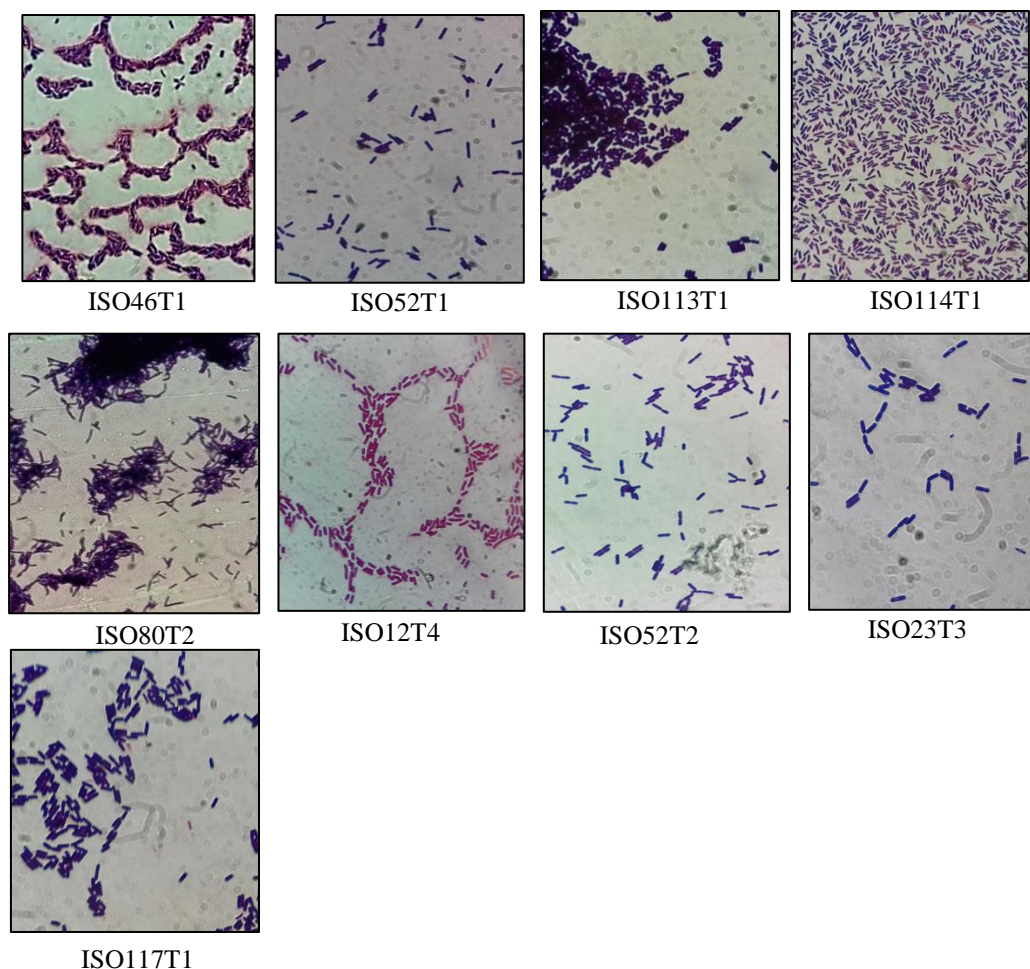


Figura 9. Visualização em microscópio óptico de 25 isolados positivos para promoção de crescimento no *screening*, por meio da técnica de coloração de Gram.

O dendrograma de similaridade obtido a partir da caracterização morfológica deu origem a três grupos e oito subgrupos (Figura 10). O agrupamento dos isolados bacterianos permitiu verificar que existe uma alta similaridade entre as morfoespécies, principalmente dentro de cada subgrupo.

No dendrograma, verifica-se que 21 isolados (84% do total) foram agrupados nos subgrupos Ib, IIa, IIb, IIIa e IIIb) e que os oito subgrupos apresentaram 100% de similaridade, indicando alta proximidade genética entre esses micro-organismos. Os grupos I e II foram os mais representativos, sendo formados exclusivamente pelas rizobactérias identificadas como *Bacillus* (grupo *Cereus*) e com índices de similaridade acima de 80%.

O grupo III incluiu isolados pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Lysinibacillus*. O subgrupo IIIa foi formado pelos isolados 4T2 e 115T1, ambos identificados como *Lysinibacillus* pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. Entretanto esses isolados não

se agruparam da mesma forma no dendrograma com base no gene 16S rRNA e na árvore filogenética.

Além disso, por meio do dendrograma de similaridade pode-se observar que as rizobactérias formaram dois subgrupos específicos de acordo com seu local de origem. O subgrupo IIa, por exemplo, foi constituído somente por bactérias pertencentes ao tratamento II (solo com 40 t ha⁻¹ de biocarvão) e o subgrupo IIIc formado exclusivamente por bactérias originárias de solo com 120 t ha⁻¹ de biocarvão.

Assim, o dendrograma gerado com base nas características fenotípicas, permitiu agrupar claramente a maior parte dos isolados em nível de gênero e de grupo, indicando que a morfologia das colônias bacterianas pode ser utilizada como um parâmetro a mais na identificação desses micro-organismos. Entretanto, vale mencionar que a formação de vários grupos com 100% de similaridade não refletem os resultados obtidos pela identificação do gene 16S rRNA. Isso ocorre, pois micro-organismos com fenótipos semelhantes podem possuir características genotípicas distintas, visto que o fenótipo é resultado da expressão genotípica e da influência do ambiente.

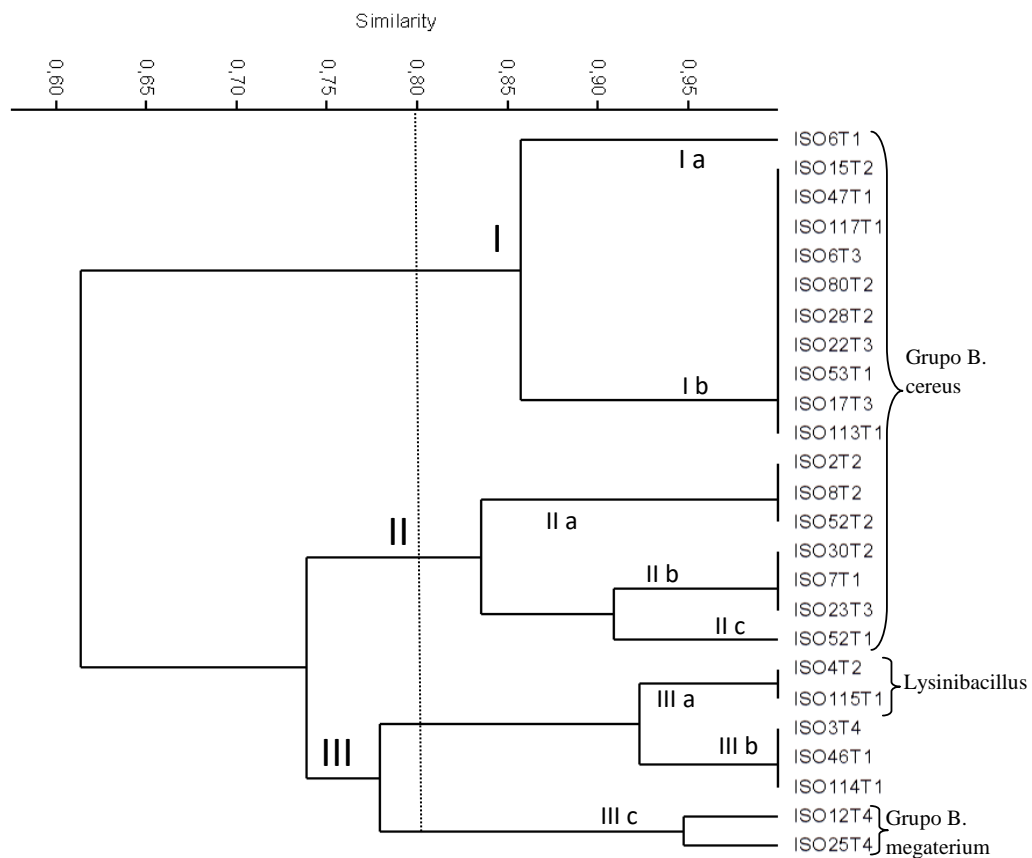


Figura 10. Dendrograma gerado pelo agrupamento UPGMA, construído com base no coeficiente de similaridade de Bray-Curtis, a partir de dados da caracterização morfológica de 25 isolados de rizobactérias. *Coeficiente de correlação ($r = 0,92$)

5.3.1.2. Reação de ERIC-PCR

A análise realizada pela técnica ERIC-PCR deu origem a padrões de bandas específicos que permitiram agrupar de forma adequada grande parte das rizobactérias avaliadas, produzindo resultados satisfatórios quanto à separação dos isolados em nível de gênero ou mesmo em nível de grupo. Entretanto, o dendrograma apresentou baixos coeficientes de similaridade em alguns dos grupos formados, provavelmente pelo fato da reação de ERIC-PCR não ter produzido, para alguns dos isolados, bandas suficientes ou bandas com baixa nitidez, que pudessem ser comparadas às dos demais isolados. Baixos coeficientes de similaridade indicam pouca proximidade genética, o que não corrobora com as informações obtidas pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA (Figura 11).

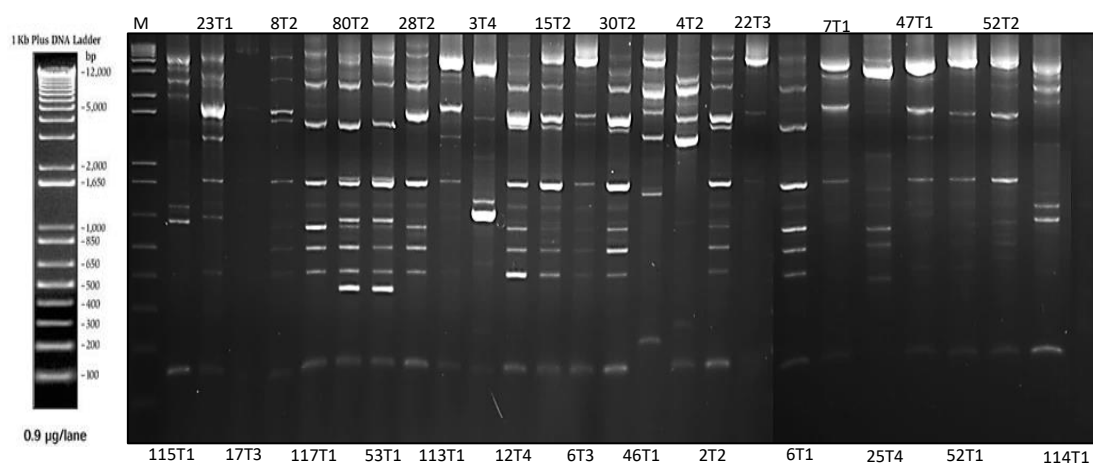


Figura 11. Visualização do eletroferograma de 23 isolados bacterianos com perfis de bandas fornecidos pela técnica ERIC-PCR.

A partir do dendrograma de similaridade obtido pode-se observar que foram formados quatro grupos principais com seus respectivos subgrupos (Figura 12).

O grupo I, subdividiu-se em 3 subgrupos. O isolado 46T1 (subgrupo Ia), o qual foi identificado como *Bacillus* sp., não se agrupou diretamente aos demais isolados do grupo I, corroborando com a identificação pelo sequenciamento do gene 16S rRNA e discordando da caracterização morfológica, na qual se agrupou com o isolado 3T4 pertencente ao grupo *B. cereus*. Os subgrupos Ib, Ic e Id foram compostos exclusivamente por isolados do grupo *B. cereus*. Vale salientar que os isolados 17T3 e 22T3 apresentaram a formação de apenas uma banda e duas bandas respectivamente, o que não permitiu seu agrupamento de forma correta no dendrograma, e proporcionou

baixos coeficientes de similaridade que não corroboram as informações obtidas pelo sequenciamento do gene 16S rRNA.

No grupo II, ficaram alocados dois isolados, 3T4 e 4T2, identificados como *Bacillus* sp. grupo *B. cereus* e *Lysinibacillus* sp., respectivamente. Esse grupo foi o que mais diferiu em relação aos demais, pois se agruparam juntamente e pertencerem a gêneros distintos, o que difere das informações obtidas no sequenciamento do gene 16S rRNA.

O grupo III dividiu-se em dois subgrupos, ambos contendo apenas isolados do gênero *Bacillus*, sendo que no subgrupo IIIa ficaram agrupados somente isolados pertencentes ao grupo *B. cereus*, com dois agrupamentos (53T1-80T2 e 15T2-6T3) com 100% de similaridade, entre os isolados. Os isolados 25T4 e 12T4 ambos identificados como *Bacillus* sp. (grupo megaterium), os quais foram agrupados juntos tanto no dendrograma gerado em função da caracterização morfológica como na árvore filogenética, também se agruparam (70% de similaridade) da mesma forma no subgrupo IIIb no dendrograma formado a partir da reação de ERIC-PCR.

O subgrupo IV apresentou duas subdivisões (IVa e IVb). No subgrupo IVa agruparam-se somente isolados do grupo *B. cereus*. O subgrupo IVb formou dois outros subgrupos, sendo que no subgrupo IVb.1 foi alocado somente o isolado 7T1 (grupo *B. cereus*) e no grupo IVb.2 foram agrupados os isolados 115T1 e 114T1, ambos identificados como *Lysinibacillus* sp., apresentando alto coeficiente de similaridade (85%), corroborando com a caracterização morfológica e com a filogenia realizada com base no sequenciamento do gene 16S rRNA.

Pelo dendrograma formado a partir dos dados obtidos por meio da ERIC-PCR pode-se observar que os isolados pertencentes ao grupo *B. cereus*, seguiram basicamente o mesmo padrão de agrupamento tanto da caracterização morfológica com identificação pelo gene 16S rRNA. Padrão este que consiste na formação dentro do grupo *B. cereus*, de subgrupos contendo uma ou mais espécies de *Bacillus* que compõe esse grupo.

Entretanto, é válido salientar que pela reação de ERIC-PCR, assim como pela caracterização morfológica isolados de *Bacillus* spp. e *Lysinibacillus* spp. ficaram agrupados juntamente em pelo menos um subgrupo, diferindo do agrupamento observado pelo sequenciamento do gene 16S, o qual permitiu a separação dos gêneros em grupos bastante distintos.

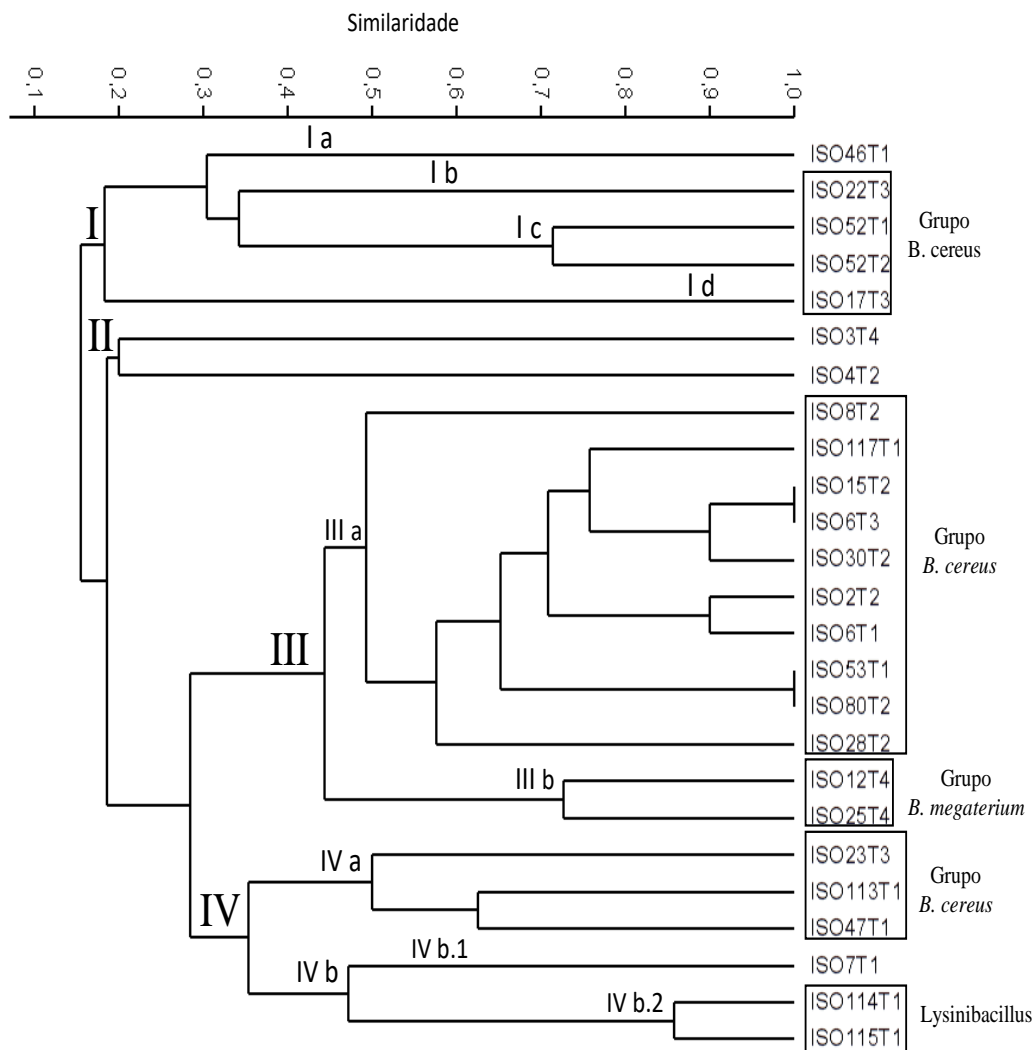


Figura 12. Dendrograma gerado pelo agrupamento UPGMA, construído com base no coeficiente de similaridade de Jaccard, a partir da análise de bandas polimórficas geradas por Eric-PCR de 25 isolados de rizobactérias.*Coeficiente de correlação = 0,916.

5.3.1.3. Identificação das rizobactérias pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

O método de extração do DNA dos isolados bacterianos selecionados permitiu a obtenção de material genético com boa qualidade, com exceção dos isolados 52T2 e 15T2, os quais não puderam ser identificados, pois não houve amplificação do DNA. Dentre as amostras obtidas, foram selecionadas aquelas com fragmentos de tamanho molecular acima de 10 Kb com relação aproximada de 260/280 nm de 1,8 a 2,0, os quais proporcionaram a obtenção de seqüências com tamanho variando de 768 a 1.363 pb.

Por meio do sequenciamento da região 16S rRNA foi possível verificar que todos os isolados bacterianos identificados são pertencentes ao filo Firmicutes e aos

gêneros *Lysinibacillus* e *Bacillus*, sendo que 86,95% das rizobactérias avaliadas foram enquadradas neste último. Na tabela 11 são apresentados os dados relacionados à identificação dos 23 isolados positivos no screening de promoção de crescimento.

Tabela 11. Relação de identidade entre sequências obtidas neste estudo e sequências depositadas no GenBank.

Linhagem	GenBank n	Tamanho (pb)	ID Blast %	SDT ID score%*	GenBank n/Espécies relacionadas
8T2	MH547253	1354	99	99.9	KX245015/ <i>Bacillus thuringiensis</i>
17T3	MH547254	1256	99	91.9	MG205930/ <i>Bacillus thuringiensis</i>
23T3	MH547255	1293	99	95.9	MG205930/ <i>Bacillus thuringiensis</i>
115T1	MH547256	1265	99	92.9	KF527213/ <i>Lysinibacillus sphaericus</i>
28T2	MH547257	1354	98	98.5	KX057625/ <i>Bacillus cereus</i>
53T1	MH547258	1354	98	98.6	KX950679/ <i>Bacillus cereus</i>
80T2	MH547259	908	95	64	KX057625/ <i>Bacillus cereus</i>
117T1	MH547261	1354	94	94.3	KX057625/ <i>Bacillus cereus</i>
3T4	MH547260	1355	99	99.3	KX245015/ <i>Bacillus thuringiensis</i>
6T3	MH547262	1356	99	99.4	MF370350/ <i>Bacillus cereus</i>
113T1	MH547263	1311	98	96.9	KX057625/ <i>Bacillus cereus</i>
2T2	MH547265	1354	99	98.8	KF033125/ <i>Bacillus cereus</i>
30T2	MH547266	1353	99	99.1	MF370350/ <i>Bacillus cereus</i>
12T4	MH547264	815	98	58.3	KR999903/ <i>Bacillus flexus</i>
4T2	MH547267	1358	99	91.7	MG984077/ <i>Lysinibacillus macroides</i>
6T1	MH547268	815	94	91.4	KY780512/ <i>Bacillus cereus</i>
7T1	MH547270	1354	88	87.7	JF701942/ <i>Bacillus</i> sp.

(continuação)

Linhagem	GenBank n	Tamanho (pb)	ID Blast %	SDT ID score%*	GenBank n/Espécies relacionadas
46T1	MH547269	1315	96	97.4	KU922484/ <i>Bacillus altitudinis</i>
25T4	MH547271	1355	96	96.1	KX268131/ <i>Bacillus megaterium</i>
47T1	MH547272	1363	95	95.3	KX057625/ <i>Bacillus cereus</i>
114T1	MH547273	768	99	99.5	EU982902/ <i>Lysinibacillus sphaericus</i>
22 T3	MH547274	1358	98	98.8	KX816414/ <i>Bacillus cereus</i>
52T1	MH547275	1307	95	96.7	KF033125/ <i>Bacillus cereus</i>

*Com base no programa Sequence Demarcation Tool (SDT v.1.2)

A análise filogenética de 53 sequências baseadas em 1354 caracteres, incluindo lacunas, das quais 30 foram obtidas no GenBank, foi realizada a partir do melhor modelo evolutivo selecionado (HKY + G). A topologia da árvore obtida (Fig. 13) foi derivada da análise de MV mais os valores de probabilidade posteriores nos principais ramos contendo três gêneros da família Bacillaceae com vinte e um taxa. Das vinte e três linhagens obtidas no presente estudo, vinte foram caracterizadas como *Bacillus*, sendo dezessete pertencentes ao grupo *Cereus* e três caracterizadas como *Lysinibacillus* mais relacionadas com *L. sphaericus* e *L. macroides*.

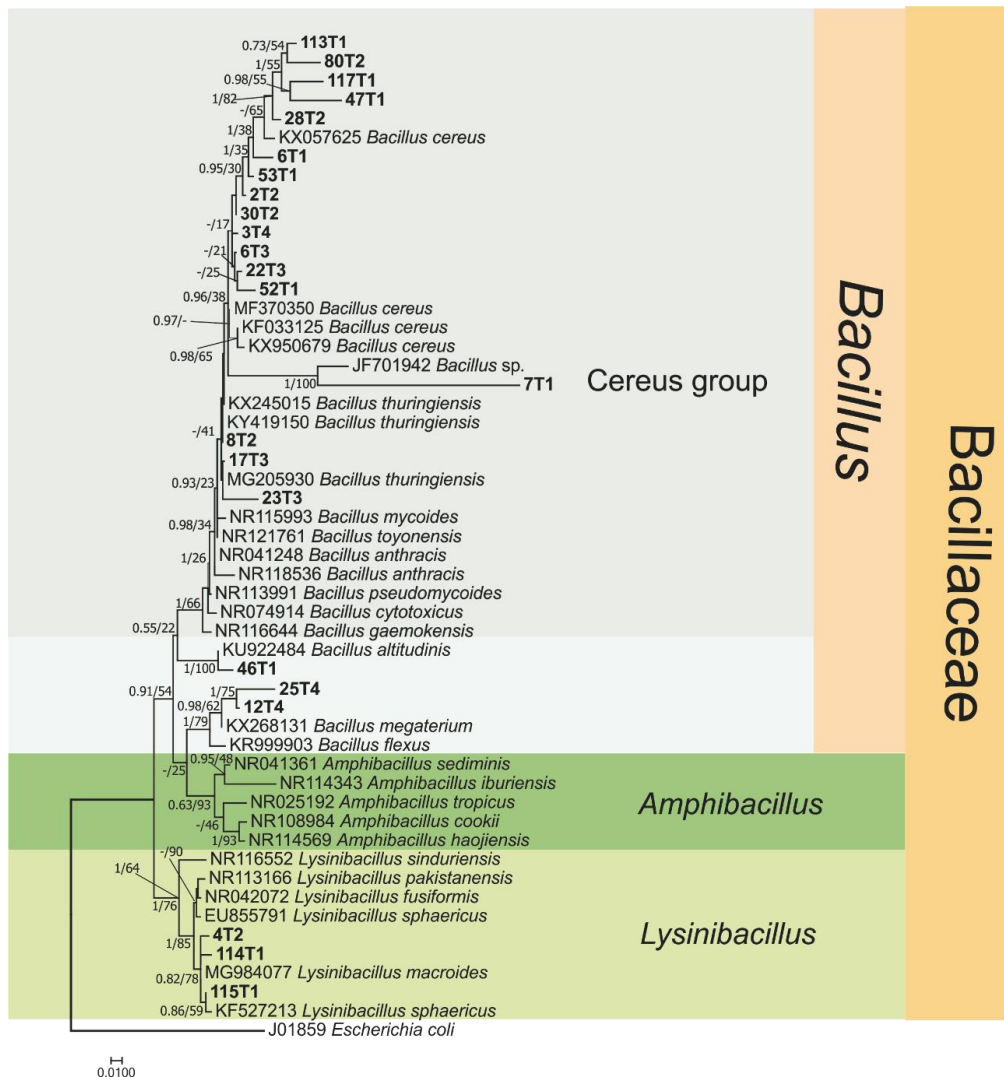


Figura 13. Filograma resultante de um consenso de Máxima Verossimilhança e Análise Bayesiana baseado no alinhamento da região 16S rRNA, com os valores de bootstrap e probabilidade a posteriori. Os isolados obtidos neste estudo estão marcados em negrito e a árvore está enraizada na linhagem *Escherichia coli* J01859.

Na árvore filogenética obtida pelo método de Máxima Verossimilhança pode-se observar que houve a formação de dois ramos principais, formados pelos gêneros *Lysinibacillus* e *Bacillus*.

Apesar das altas porcentagens de cobertura e similaridade (identidade) logradas por meio das comparações das sequências obtidas nesse trabalho com as do GenBank, os baixos valores de bootstrap fornecidos pela análise filogenética, não permitiram diferenciar os isolados em nível de espécie (Figura 13).

Por meio da análise filogenética, observa-se que os isolados **6T1**, **6T3**, **2T2**, **8T2**, **28T2**, **7T1**, **47T1**, **117T1**, **80T2**, **17T3**, **23T3**, **22T2**, **52T1**, **53T1**, **117T1**, **3T4** e **30T** constituem o clado formado exclusivamente por espécies do grupo *B. cereus*

obtidas no Genbank. Entretanto, a maior parte dos pontos de ramificação dentro do clado se encontra colapsado e apresenta baixos valores de bootstrap, não sendo possível inferir com confiança a espécie desses isolados bacterianos apenas com base na sequência parcial do gene 16S rRNA.

Com base em dados de identidade pareada (Fig. 14), a linhagem 114T1 apresentou > 99% de identidade com *L. sphaericus* e *L. macroides*. As linhagens com identidade > 99% pertencentes ao clado Bacillus, todas estão agrupadas no grupo Cereus, sendo 8T2, 3T4 mais relacionadas com *B. thuringiensis* e 6T3, 30T2 com *B. cereus*. Cinco linhagens tinham 98% de identidade e treze eram <97% (Tabela 8).

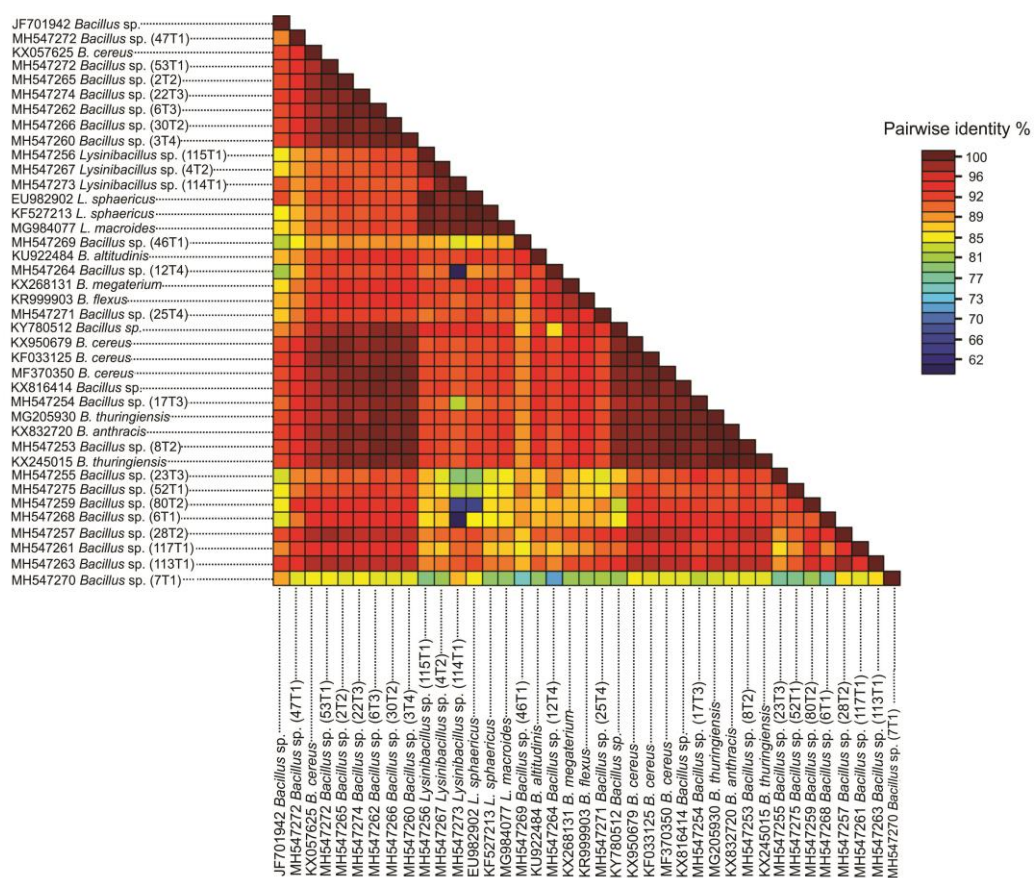


Figura 14. Matriz de identidade pareada, codificada por cores, gerada a partir de 39 sequências da região 16S rRNA. Cada célula colorida representa uma pontuação percentual de identidade entre duas seqüências indicadas horizontalmente à esquerda e verticalmente na parte inferior. Uma tecla colorida indica a correspondência entre as identidades dos pares e as cores exibidas na matriz; As linhagens obtidas neste estudo estão identificadas entre parênteses.

A distribuição baseada na identidade pareada corroborou os dados obtidos pelas análises filogenéticas (MV e IB). No entanto, para o clado *Lysinibacillus*, a relação entre *L. sphaericus* e *L. macroides* que apresentou identidade > 99% não está bem

definida, dificultando a identificação na região 16S devido à alta homologia entre estas taxa.

Para o gênero *Bacillus*, embora a região 16S também apresente baixa resolução filogenética (Janda e Abbott, 2007), neste estudo *B. anthracis* e *B. cereus* que apresentaram 97,5% de identidade, a inferência bayesiana baseada no modelo HKY + G permitiu a diferenciação de *B. anthracis* dos demais representantes do grupo *Cereus* com alto suporte de PP.

As linhagens que apresentaram maior identidade com *B. cereus* e *B. thuringiensis* responderam à tendência de agrupamento observada tanto na análise de identidade pareada pelo componente Vizinho quanto nas inferências filogenéticas, apesar do baixo suporte de PP e bootstrap. Entre as linhagens do gênero *Bacillus* que não pertencem ao grupo *B. cereus*, 46T1 está mais relacionada com *B. altitudinis* e 25T4 e 12T4 com *B. megaterium*, todas com alto suporte estatístico. Segundo Petti (2007), a identidade <97% pode indicar a existência de novas espécies.

Diversos autores relatam que a análise do gene 16S rRNA não é suficiente para diferenciar em nível de espécie, micro-organismos muito próximos geneticamente, sendo necessário o sequenciamento de outras regiões do genoma bacteriano. Entre eles, González (2008) menciona que o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA não possibilitou o agrupamento de isolados de *Rhizobium* sp. e *Sinorhizobium* sp. em nível de espécie.

Cabe destacar que Souza (2011), também não conseguiu diferenciar as espécies do grupo *B. megaterium* e *B. pumilus*, mencionando que os isolados bacterianos pertencentes a esses grupos precisam ter o gene *gyrB* sequenciado para diferenciação destas espécies. Liu *et al.* (2013) também relatam que não é possível diferenciar as espécies que compõe o grupo *B. pumilus* somente pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. Além do gene *gyrB*, Petti (2007) menciona que os genes *rpoB*, *groEL* e *recA*, por exemplo, também podem ser utilizados para identificação de diversas espécies bacterianas. Além disso, a análise de outras regiões como a 23S rRNA e as regiões espaçadoras entre os genes 16-23S rRNA poderiam fornecer melhores resultados na diferenciação de espécies com grande semelhança genética.

5.3.2. Ensaio de confirmação no substrato Vivatto Plus®

No ensaio de confirmação no substrato Vivatto Plus® não houve diferença significativa entre os 25 isolados avaliados e a testemunha, para as variáveis CPA, NF, MSPA e MST (Tabela 12).

Em relação à variável DC, houve diferença significativa entre 8 isolados (32%) e a testemunha, mas não entre si. Entre os isolados capazes de propiciar incrementos para essa variável, as médias variaram entre 1,96 e 2,11 mm, enquanto a testemunha (controle negativo) apresentou média de 1,85 mm. De acordo com Silva *et al.* (2012), o DC é um bom indicador da qualidade da muda para a sobrevivência e crescimento após o transplante para o local definitivo.

Quanto à MSSR, houve diferença significativa entre 10 isolados (40%) e a testemunha, mas não entre si. As médias dos isolados que proporcionaram aumento para essa variável variaram entre 0,007 e 0,009 g, e por sua vez a testemunha apresentou média de 0,004 g. É importante considerar que plantas com sistema radicular bem desenvolvido têm mais chances de sobrevivência no campo (Campos e Uchida 2002), pois quanto maior quantidade de raiz mais nutrientes estarão disponíveis no intervalo entre o transplante e a formação de novas raízes (Minami 1995).

Tabela 12. Efeito de 25 isolados bacterianos na promoção de crescimento de mudas de tomateiro cultivar Santa Cruz Kada sobre as variáveis: altura da planta (AP), diâmetro do colo (DC), número de folhas (NF), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca do sistema radicular (MSSR) e massa seca total (MST), aos 20 dias após a semeadura no substrato Vivatto plus®.

Tratamentos	AP (cm) ¹	DC (mm) ¹	NF ²	MSPA (g) ¹	MSSR (g) ¹	MST (g) ¹
Testemunha	12,46 a	1,85 b	2,6 a	0,042 a	0,004 b	0,046 a
B. cereus	13,53 a	2,09 a	3,3 a	0,057 a	0,007 a	0,064 a
ISO3T4	13,29 a	2,07 a	2,9 a	0,050 a	0,005 b	0,055 a
ISO4T2	12,91 a	2,06 a	2,5 a	0,049 a	0,007 a	0,057 a
ISO6T1	12,66 a	1,80 b	2,7 a	0,045 a	0,005 b	0,051 a
ISO15T2	12,36 a	1,68 b	2,3 a	0,038 a	0,007 a	0,045 a
ISO7T1	13,24 a	1,88 b	3,0 a	0,054 a	0,007 a	0,062 a
ISO25T4	13,17 a	1,86 b	3,0 a	0,050 a	0,008 a	0,059 a
ISO22T3	13,54 a	2,01 a	2,8 a	0,051 a	0,009 a	0,061 a
ISO53T1	13,35 a	2,17 a	2,7 a	0,051 a	0,007 a	0,058 a
ISO23T3	12,70 a	1,87 b	2,4 a	0,042 a	0,008 a	0,051 a
ISO52T1	12,79 a	1,81 b	2,7 a	0,042a	0,008 a	0,050 a
ISO114T1	12,76 a	1,86 b	3,0 a	0,047 a	0,006 b	0,053 a
ISO17T3	13,47 a	2,11 a	3,1 a	0,051 a	0,007 a	0,059 a
ISO113T1	12,87 a	1,98 a	2,5 a	0,048 a	0,007 a	0,055 a
ISO117T1	12,63 a	1,84 b	2,7 a	0,042 a	0,004 b	0,047 a
ISO47T1	13,15 a	1,88 b	2,4 a	0,044 a	0,004b	0,047 a
ISO8T2	12,61 a	1,85 b	2,9 a	0,044 a	0,004 b	0,047 a
ISO46T1	12,07 a	1,86 b	2,6 a	0,044 a	0,004 b	0,048 a
ISO6T3	11,74 a	1,81 b	2,4 a	0,045 a	0,005 b	0,049 a
ISO30T2	13,17 a	1,96 a	2,8 a	0,044 a	0,004 b	0,049 a
ISO80T2	12,80 a	2,03 a	2,5 a	0,048 a	0,004 b	0,052 a
ISO28T2	12,47 a	1,83 b	2,6 a	0,044 a	0,004 b	0,048 a
ISO2T2	12,49 a	1,86 b	2,6 a	0,041 a	0,004 b	0,045 a

Tratamentos	(continuação)					
	AP (cm) ¹	DC (mm) ¹	NF ²	MSPA (g) ¹	MSSR (g) ¹	MST (g) ¹
ISO115T1	13,02 a	1,89 b	2,6 a	0,045 a	0,004 b	0,049 a
ISO12T4	12,75 a	1,79 b	2,4 a	0,040 a	0,004 b	0,044 a
ISO52T2	13,06 a	1,86 b	2,3 a	0,048 a	0,005 b	0,052 a
CV%	14,52	16,55	-	17,25	17,82	16,32

Média de dez repetições. ¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). ²Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Dunn ($p \leq 0,05$).

Em relação à variável DC, o isolado ISO53T1 destacou-se entre os demais que apresentaram maior índice de aumento (17,29%). Os demais isolados apresentaram índices variando entre 5,94 e 14,05% (Figura 15).

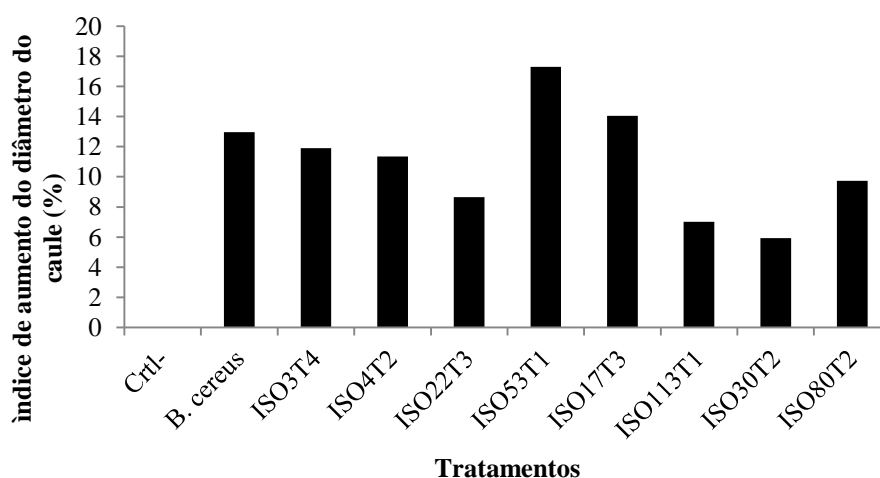


Figura 15. Ganhos percentuais relativos a 8 isolados de rizobactérias comparados com o tratamento em água (controle) para massa seca do sistema radicular. Tratamento controle (Ctrl-) considerado com índice de aumento igual a 0.

Em relação aos ganhos percentuais obtidos para a MSSR, o isolado ISO22T3 apresentou o maior aumento (125%). Os demais isolados apresentaram índices variando entre 75 e 100%. (Figura 16). De forma semelhante aos resultados obtidos nesse trabalho, Ashraf *et al.* (2011) verificaram que isolados de *Azotobacter* sp. inoculados em mudas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L. promoveram o aumento da massa seca das raízes em 96%.

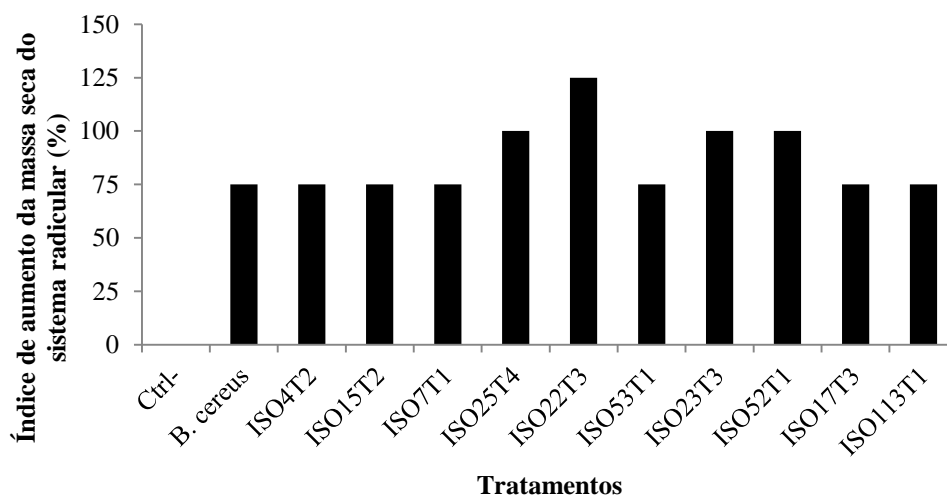


Figura 16. Ganhos percentuais relativos a 10 isolados de rizobactérias comparados com o tratamento em água (controle) para a variável massa seca da parte aérea (MSPA). Tratamento controle (Ctrl-) considerado com índice de aumento igual a 0.

Assim como nesse ensaio de confirmação, Damasceno (2011) não observou diferença significativa para a altura e produção de massa seca da parte aérea de plantas de tomateiro inoculadas com actinobactérias. Entretanto, verificou diferenças significativas entre os tratamentos com actinobactérias e a testemunha quanto ao diâmetro do caule e massa seca das raízes. O isolado BFT 104 destacou-se promovendo incremento de 19,6% no diâmetro caulinar em relação às mudas produzidas no substrato não infestado, sendo esse valor semelhante ao obtido nesse trabalho (17,29%) pelo isolado ISO53T1. Com relação à MSSR, os maiores ganhos percentuais foram de 76% em relação ao tratamento controle, sendo esse valor inferior a maior porcentagem de ganho obtida nesse estudo (125%) pelo isolado ISO22T3.

Ao se comparar, no teste de confirmação, a distribuição dos isolados quanto à promoção de crescimento, de acordo com a origem (áreas com diferentes doses de biocarvão), assim como no *screening*, o teste exato de Fisher mostrou não haver relação entre origem dos isolados e promoção de crescimento (Tabela 13). Portanto, os isolados pertencentes às 4 áreas de coleta referentes as doses 0, 40, 80 e 120 t ha⁻¹, reagem do mesmo modo ao teste de promoção de crescimento não havendo influência das doses de biocarvão sobre o resultado.

Tabela 13. Distribuição de frequência do resultado do teste de confirmação da promoção de crescimento de 25 isolados bacterianos, segundo a origem em Manaus (AM), 2017.

Doses da biocarvão (t ha ⁻¹)	Promoção de crescimento				Total
	Positivo		Negativo		
	N	%	N	%	
0	4	40,0	6	60,0	10 (40%)
40	4	50,0	4	50,0	8 (32%)
80	3	37,5	1	62,5	4 (16%)
120	2	66,7	1	33,3	3 (12%)
Total	13	52,0	12	48,0	25 (100%)

Estatística: *p* valor (Fisher) = 0,71709^{ns}.

Esses dados, corroboram os resultados obtidos no *screening*, e sugerem que o biocarvão, em altas doses, apesar de reduzir a população bacteriana cultivável do solo não rizosférico e de bactérias capazes de colonizar ativamente o sistema radicular de plântulas de tomateiro, não interfira negativamente sobre grupos específicos de bactérias capazes de promover o seu crescimento.

No que se refere a relação entre origem dos isolados e capacidade de promoção de crescimento, sabe-se que o biocarvão pode interferir de forma positiva ou negativa sobre os diversos grupos de micro-organismos residentes no solo. Nesse trabalho, apesar dos resultados indicarem que não houve influência do biocarvão sobre a capacidade das rizobactérias em promover o crescimento de plântulas de tomateiro, há poucos estudos relacionando a influência do biocarvão sobre grupos específicos de rizobactérias que sejam capazes de formarem associações planta-rizobactérias efetivas que proporcionem o crescimento vegetal. Nesse sentido, mais estudos devem ser realizados por meio da avaliação de uma gama maior de isolados, de forma a se obter resultados mais sólidos que permitam um real entendimento dessa relação.

Em suma, pelos resultados obtidos no *screening* e teste de confirmação, verifica-se baixa estabilidade de grande parte dos isolados visto que ora os isolados promovem o crescimento e ora não influenciam o desenvolvimento das plântulas de tomateiro. Barbosa (2009), avaliando promoção de crescimento em mudas de tomateiro, verificou que nenhum dos isolados selecionados diferiu da testemunha em relação à altura e matéria seca das plantas, nas etapas de confirmação, caracterizando também falta de estabilidade dos isolados bacterianos.

Algumas causas podem ser atribuídas a essa alta instabilidade observada. Nesse sentido, Siddiqui *et al.* (2001) sugerem que o benefício promovido pelas

rizobactérias esteja relacionado ao nível de fertilidade do substrato e como o substrato utilizado no *screening* e nos ensaios de confirmação foi obtido de diferentes lotes, pode ter havido diferenças no teor de nutrientes e, conseqüentemente, desempenhos distintos dos isolados nas diferentes etapas. Além disso, como o substrato utilizado não se encontrava em condições esteréis, os micro-organismos ali presentes podem ter restringido ou inibido a atuação de alguns dos isolados bacterianos inoculados em maior ou menor grau nos diferentes experimentos, o que também pode explicar a instabilidade de determinadas rizobactérias avaliadas nesse trabalho. Neste contexto, Freitas *et al.* (2003) apontam que a instabilidade por parte de algumas rizobactérias é o principal obstáculo ao seu emprego em larga escala. Entretanto, uma maior estabilidade desses isolados poderia ser alcançada por meio de manipulação genética (Rodríguez e Fraga 1999). Outra opção seria a utilização de um conjunto de isolados que pudessem atuar sinergicamente, aumentando as chances de sucesso com a inoculação.

Por outro lado, os isolados ISO4T2, ISO22T3, ISO53T1, ISO17T3 e ISO113T1, entre os 53 avaliados, correspondente a 9,43%, mostraram-se capazes de promover efetivamente o crescimento de plântulas de tomateiro, pois além de apresentarem bons resultados no *screening*, proporcionaram ganhos tanto em diâmetro caulinar como em massa seca do sistema radicular no ensaio de confirmação no substrato Vivatto Plus[®]. É válido mencionar que o grupo *B. cereus* sensu lato foi o que apresentou a maior porcentagem de indivíduos (80%) capazes de promover o crescimento vegetal no teste de confirmação.

O gênero *Bacillus* tem sido amplamente estudado, cuja eficiência em promover o crescimento de uma ampla gama de espécies vegetais foi mencionada por vários pesquisadores (Xie et al, 2014; Ortíz-Castro et al. 2008; Chakraborty *et al.* 2006; Freitas e Vildoso 2004). Araujo e Guerreiro (2010), avaliando diferentes isolados de *Bacillus* promotores de crescimento de milho cultivado em solo autoclavado e natural, constataram que os isolados bacterianos BRG-2, CAS-2, NGR-1, PNP-2, PRP-2 e TAC-2 destacaram-se como promotores de crescimento do milho, incrementando a produção de biomassa pelas plantas avaliadas 50 dias após a semeadura. Lazzaretti e Melo (2005) observaram em condições de casa- de-vegetação que a aplicação de *B. subtilis* em solos esterilizados em conjunto com *Rhizobium* sp., promoveu um aumento significativo no peso da matéria seca das raízes (89%) e da parte aérea (83%) de plantas de feijoeiro.

Em relação ao gênero *Lysinibacillus*, representado nesse trabalho pelos isolados 114T1, 115T1 e 4T2, a espécie *Lysinibacillus sphaericus* (Meyer e Neide, 1904), por exemplo, é bastante conhecida por sua atividade larvicida (GUIDI *et al.*, 2013; BERRY, 2012). Entre os trabalhos realizados com essa espécie relacionados à promoção de crescimento vegetal, Martinez e Dussan (2017) verificaram que as 4 estirpes de *L. sphaericus* (CBAM5, III (3) 7, OT4b.31 e OT4b.49) avaliadas foram capazes de promover incrementos na altura, comprimento da raiz, área foliar e número de folhas em *Canavalia ensiformis* (L.) DC. Naureen *et al.* (2017), explorando o potencial de *L. sphaericus* estirpe ZA9 como promotora de crescimento, em casa-de-vegetação, não observaram diferenças significativas no comprimento da raiz e parte aérea em mudas tratadas com essa bactéria aos 10 dias após a semeadura ($p \geq 0,05$). Entretanto, aos 21 dias após a semeadura, os autores observaram que houve aumento significativo no comprimento da parte aérea das mudas tratadas em comparação às mudas não inoculadas e o controle positivo (*B. cereus* Z2-9).

Vale salientar que mesmo comprovada à capacidade de promoção de crescimento dos isolados em casa-de-vegetação não se pode afirmar que estes irão se comportar da mesma forma em campo. Isso se deve ao fato que sob tais condições, as rizobactérias inoculadas estão sobre forte pressão do ambiente, como clima, tipo de solo e população de micro-organismos que residem no mesmo nicho ecológico. Dessa forma, além de estarem aptas a colonizar o sistema radicular e proliferar, devem ser capazes de competir, por abrigo, água e nutrientes com as populações de micro-organismos residentes.

Nesse sentido, as rizobactérias selecionadas nesse trabalho que apresentaram estabilidade em casa-de-vegetação devem ser reavaliadas em condições de campo, de forma a se observar como irão se comportar nesta situação, obtendo assim informações mais precisas quanto à capacidade de promoção de crescimento de plantas de tomateiro.

5.3.3. Avaliação dos mecanismos envolvidos na promoção de crescimento

5.3.3.1. Solubilização de fosfato inorgânico na forma de CaHPO_4

Quanto à capacidade de solubilização de fosfato de cálcio em meio de cultura, entre os 25 isolados avaliados apenas 2 (8%) formaram halo de solubilização (Figura 17) e foram marcados como positivos. Damasceno (2011) avaliou o potencial de 42

actinomicetos quanto à solubilização de fosfato de cálcio, entretanto, não obteve nenhum isolado com essa capacidade. Por outro lado, Leite (2012) observou que 75% das bactérias halotolerantes associadas a plantas de cana de açúcar foram capazes de solubilizar fosfato inorgânico, sendo esta porcentagem bastante superior à obtida nesse trabalho.

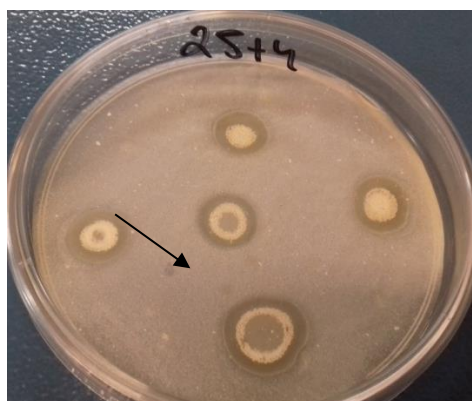


Figura 17. Solubilização de fosfato inorgânico na forma de CaHPO_4 por rizobactérias.

Os isolados capazes de solubilizar fosfato se comportaram como precoces, sendo que o início da solubilização se deu no 3º dia após a inoculação. Além disso, pelos índices de solubilização obtidos observa-se que os isolados marcados como positivos apresentaram baixa capacidade de solubilizar fosfato, apresentando $\text{IS} < 2$ (Tabela 14).

Tabela 14. Solubilização de fosfato de 25 isolados bacterianos provenientes de solo com doses crescentes de biocarvão em Manaus, AM, 2017.

Solubilização de fosfato			
Isolados	Início da Solubilização (dias)	Solubilização*	IS**
ISO117T1	-	-	-
ISO3T4	-	-	-
ISO4T2	-	-	-
ISO6T1	-	-	-
ISO15T2	-	-	-
ISO7T1	-	-	-
ISO25T4	3	+	1,62
ISO22T3	-	-	-
ISO53T1	-	-	-
ISO23T3	-	-	-
ISO52T1	-	-	-
ISO114T1	-	-	-
ISO17T3	-	-	-
ISO113T1	-	-	-
ISO47T1	-	-	-
ISO8T2	-	-	-
ISO46T1	-	-	-
ISO6T3	-	-	-

(continuação)

Solubilização de fosfato		
ISO30T2	-	-
ISO80T2	-	-
ISO28T2	-	-
ISO2T2	-	-
ISO115T1	-	-
ISO12T4	3	+
ISO52T2	-	-

*+ = Solubilização e - = Não solubilização; ** IS = Índice de solubilização

Em relação ao tratamento com a dose de biocarvão de 120 t ha⁻¹, a frequência relativa de isolados positivos para solubilização de fosfato inorgânico na forma de CaHPO₄ foi de 66,67% enquanto que para os demais tratamentos foi nula. Ao se comparar, a distribuição dos isolados quanto à solubilização de fosfato, de acordo com a origem, o teste exato de Fisher indicou haver relação entre origem dos isolados e capacidade de solubilizar fosfatos inorgânicos. Portanto, os isolados pertencentes às 4 áreas de coleta referentes as doses 0, 40, 80 e 120 t ha⁻¹, não se comportam do mesmo modo no teste de solubilização de fosfato, evidenciando portanto, influência das doses de biocarvão sobre a população de bactérias solubilizadoras de fosfato presentes no solo não rizosférico (Tabela 15). Vale mencionar que somente na área com a maior dose de biocarvão foram encontradas rizobactérias pertencentes ao grupo *B. megaterium* capazes de solubilizar fosfato de cálcio na forma inorgânica.

Tabela 15. Distribuição de frequência do resultado do teste de solubilização de fosfato de 25 isolados bacterianos, segundo a origem em Manaus (AM), 2017.

Doses da biocarvão (t ha ⁻¹)	Solubilização de fosfato				Total
	Positivo		Negativo		
	N	%	N	%	
0	0	0	10	100	10 (40%)
40	0	0	8	100	8 (32%)
80	0	0	4	100	4 (16%)
120	2	66,67	1	33,33	3 (12%)
Total	2	8	23	92	25 (100%)

Estatística: *p* valor (Fisher) = 0,01.

Esses dados indicam que além do biocarvão na dose mais elevada não ter reduzido a população de micro-organismos capazes de promover o crescimento de plântulas de tomateiro, possivelmente apresentou efeitos benéficos sobre bactérias do grupo *B. megaterium*. Corroborando com esses dados, Egamberdieva *et al.* (2016) observaram solubilização positiva de P causada por 7 isolados de 4 gêneros (20%) provenientes da rizosfera de soja em solo controle e por 16 isolados de 11 gêneros

(37%) provenientes do solo modificado com hidrocarvão (HTC char). Da mesma forma, Anderson *et al.* (2011) sugerem que o biocarvão seja capaz de promover o crescimento de grupos de bactérias envolvidas na solubilização de fósforo como, por exemplo, o gênero *Mycobacterium*, e Siddiqui *et al.* (2016) mencionam que esse incremento se dê, provavelmente, em função da criação de nichos favoráveis à sobrevivência desses grupos, permitindo dessa forma a mineralização e solubilização de formas orgânicas e inorgânicas de P.

Outra hipótese que pode ser aventada é que o biocarvão, conforme aumento das doses, incrementa a disponibilidade de P na camada de 0-10 cm do solo (Padilha, 2017), favorecendo grupos de micro-organismos como as bactérias solubilizadoras de fósforo visto que há maior disponibilidade do elemento requerido por esse grupo bacteriano. Corroborando com a hipótese apresentada, Sylvester-Bradley (1982) observou que a proporção de bactérias capazes de solubilizar fósforo aumentou com a adubação fosfatada (superfosfato triplo + superfosfato simples) em gramíneas e leguminosas (com exceção de *Hygrophoropsis rufa* (D.A. Reid) Knudsen, 2008, *Panicum maximum* Jacq., *S. guianensis* 1022 e *S. capitata* Vog), sugerindo que os micro-organismos solubilizadores de fósforo tenham uma vantagem na competição com outros micro-organismos. Por outro lado, em desacordo com a hipótese levantada, Barroti e Nahas (2000), avaliando a população microbiana total e solubilizadora de fósforo em solo submetido a diferentes sistemas de cultivo, não constataram a influência da adubação fosfatada (superfosfato simples e fósforo de Araxá) sobre o número de bactérias nos solos, cultivados ou não.

5.3.3.2. Avaliação da produção de ácido indol acético (AIA)

Quanto à produção de ácido indol acético (Figura 18), 18 isolados (75%) foram positivos pela avaliação colorimétrica (Tabela 16).

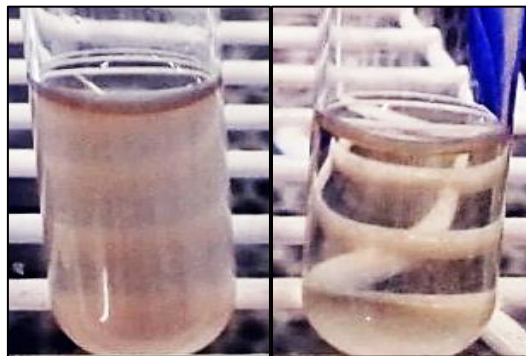


Figura 18. Produção de ácido indol acético por rizobactérias: diferentes padrões de cores.

Tabela 16. Caracterização dos 25 isolados positivos nos testes de promoção de crescimento quanto à produção de ácido indol acético (AIA).

Isolados	Produção de AIA	Isolados	Produção de AIA
ISO117T1	+	ISO113T1	+
ISO3T4	+	ISO47T1	-
ISO4T2	-	ISO8T2	+
ISO6T1	+	ISO46T1	+
ISO15T2	+	ISO6T3	-
ISO7T1	+	ISO30T2	+
ISO25T4	+	ISO80T2	+
ISO22T3	-	ISO28T2	-
ISO53T1	+	ISO2T2	+
ISO23T3	+	ISO115T1	+
ISO52T1	-	ISO12T4	-
ISO114T1	+	ISO52T2	+
ISO17T3	+	<i>Bacillus cereus</i>	+

Ao se comparar, nos testes de confirmação, a distribuição dos isolados quanto à produção de ácido indol acético, de acordo com a origem (áreas com diferentes doses de biocarvão), o teste exato de Fisher mostrou não haver relação entre origem dos isolados e a produção de ácido indol acético (Tabela 17). Os dados indicam que, além do biocarvão na dose mais elevada não ter reduzido a população de micro-organismos capazes de promover o crescimento de plântulas de tomateiro, também não selecionou grupos específicos de rizobactérias capazes de produzir ácido indol acético.

Tabela 17. Distribuição de frequência do resultado do teste de produção de ácido indol acético de 25 isolados bacterianos, segundo a origem em Manaus (AM), 2017.

Doses da biocarvão (t ha ⁻¹)	Produção de AIA				Total
	Positivo		Negativo		
	N	%	N	%	
0	7	70	3	30	10 (40%)
40	6	75	2	25	8 (32%)
80	2	50	2	50	4 (16%)
120	2	66,67	1	33,33	3 (12%)
Total	17	68	8	32	25 (100%)

Estatística: p valor (Fisher) = 0,8602^{ns}.

Respostas positivas no crescimento das plantas, logradas por meio da inoculação de rizobactérias, podem dar-se de forma direta ou indireta. Diretamente podem ocorrer por meio de mecanismos de produção de hormônios, como as auxinas (Spaepen 2015), solubilização de fosfato (Oteino *et al.* 2015), produção de sideróforos

(Pidello 2003) e ácido cianídrico. Indiretamente, o principal mecanismo associado à promoção de crescimento vegetal promovida pelas rizobactérias é a modificação da microbiota na rizosfera, por meio da supressão de micro-organismos deletérios (Kloepper e Schroth 1981).

Neste trabalho, há indicativos que a promoção de crescimento possa ter ocorrido em função da solubilização de fosfato e produção de ácido indol acético. Entretanto, não há subsídios para se afirmar que os ganhos obtidos ocorreram devido a atuação indireta da rizobactérias por meio do biocontrole de micro-organismos presentes na rizosfera. Essa possível atuação como agentes de promoção de crescimento por meio do controle biológico deve ser investigada por meio de estudos específicos enfocando a interação entre as rizobactérias inoculadas e os micro-organismos presentes na rizosfera das plântulas de tomateiro.

Quanto à solubilização de fosfato, pelo fato do fósforo ser um dos elementos que apresentam grande taxa de imobilização no solo ficando dessa forma indisponível para as plantas, a utilização de micro-organismos capazes de solubilizar fosfatos orgânicos e inorgânicos é uma ferramenta que pode contribuir para a redução da aplicação de adubos fosfatados e, conseqüentemente, reduzir custo para o produtor.

5.4. Avaliação do potencial de indução de resistência a *Corynespora cassiicola* por rizobactérias sobre mudas de tomateiro

5.4.1. Avaliação da incidência de *C. cassiicola* em mudas de tomateiro, em condições de casa-de-vegetação.

Os dados obtidos para a variável incidência mostram que na primeira avaliação (Dia 2) o isolado ISO114T1 foi o único que apresentou diferença significativa em relação ao controle negativo (Tabela 18). Contudo, se observada à severidade também na primeira avaliação, este mesmo isolado não diferiu significativamente da testemunha e ainda foi inferior estatisticamente aos isolados ISO7T1 e ISO52T2. Nos demais dias, incluindo o último dia de avaliação, não houve diferenças significativas entre os isolados e a testemunha.

Tabela 18. Médias da incidência (%) da mancha-alvo em mudas de tomateiro cultivar Santa Cruz Kada, inoculadas com 25 isolados de rizobactérias em Manaus (AM), 2017.

Tratamentos	Dia 2	Dia 4	Dia 6	Dia 8	Dia 10
Controle	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a
<i>Bacillus cereus</i>	2,8 a	2,9 a	2,9 a	2,9 a	2,9 a
ISO28T2	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a
ISO113T1	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a

(continuação)					
Tratamentos	Dia 2	Dia 4	Dia 6	Dia 8	Dia 10
ISO46T1	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a
ISO6T3	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a
ISO117T1	2,9 a	2,9 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a
ISO115T1	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a
ISO3T4	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a
ISO15T2	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a
ISO8T2	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a
ISO23T3	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a
ISO2T2	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a
ISO4T2	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a
ISO80T2	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a
ISO12T4	2,8 a	2,9 a	2,9 a	2,9 a	3,0 a
ISO53T1	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a
ISO25T4	2,9 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a
ISO17T3	2,9 a	2,9 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a
ISO6T1	2,8 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a
ISO47T1	2,8 a	2,9 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a
ISO22T3	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a
ISO30T2	2,8 a	2,8 a	2,8 a	2,8 a	2,9 a
ISO52T1	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a	3,0 a
ISO7T1	2,5 a	2,7 a	2,7 a	2,7 a	2,7 a
ISO114T1	2,3 b	2,7 a	2,7 a	2,7 a	2,7 a
ISO52T2	2,7 a	2,9 a	2,9 a	2,9 a	2,9 a
Água	0 c	0 b	0 b	0 b	0 b
CV%	12,64	9,82	7,76	7,46	6,51

Médias seguidas elas mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Considerando-se os dados de incidência, a conclusão seria que os isolados não induziram resistência nas plântulas de tomateiro a *C. cassiicola*. Entretanto, esses dados divergem daqueles coletados na avaliação da severidade da doença, os quais possibilitaram distinguir claramente quais isolados foram capazes de induzir resistência. Assim, percebe-se que nesse patossistema, a incidência não fornece dados precisos que permitam constatar diferenças quanto à indução de resistência nas mudas de tomateiro inoculadas com os diferentes isolados de rizobactérias.

Segundo Campbell e Greaves (1990), a incidência não é o melhor parâmetro a ser empregado para avaliar doenças que apresentam como sintomas as manchas foliares, sendo a severidade o mais apropriado, pois a porcentagem da área de tecido coberto por sintomas reflete melhor a quantidade de doença. Neste âmbito, Ferreira *et al.* (2012), avaliando a incidência e a severidade da mancha-branca (*Cercospora caribaea* Ciferri e Chupp e *C. Henningsii* Allescher) em mandioca, também verificaram que a incidência não foi um bom parâmetro para a avaliação a campo, pois em situações que a planta apresentavam 100% das folhas com sintomas, a maioria contava com apenas uma lesão por folha os resultados eram superestimados. Sendo assim, os mesmos autores

mencionam que os parâmetros severidade e número de lesões por folha proporcionaram melhor quantificação da intensidade de doença.

5.4.2. Avaliação da severidade de *C. cassiicola* em mudas de tomateiro, em condições de casa-de-vegetação

Pelos resultados obtidos pela escala de notas, verifica-se que 11 isolados (44%) foram capazes reduzir a severidade de *C. cassiicola* em casa-de-vegetação. Pode-se observar pelos dados de severidade apresentados pela escala de notas (Tabela 19) que os isolados ISO7T1, ISO114T1, ISO52T2 apresentaram os melhores resultados em todas as avaliações. O controle positivo (*B. cereus*) difereu do controle negativo em todas as avaliações, mas apresentou severidade média estatisticamente superior aos três isolados mencionados.

Tabela 19. Médias da severidade (escala de notas) da mancha-lvo em mudas de tomateiro cultivar Santa Cruz Kada, cujas sementes foram microbiolizadas com 25 isolados de rizobactérias em Manaus (AM), 2017.

Tratamentos	Dia 2	Dia 4	Dia 6	Dia 8	Dia 10
Controle negativo	4,52 a	5,19 a	5,66 b	5,99 a	6,09 a
<i>Bacillus cereus</i>	3,26 b	4,53 b	5,19 b	5,29 b	5,40 b
ISO28T2	5,06 a	5,86 a	6,46 a	6,69 a	6,73 a
ISO113T1	5,16 a	5,89 a	6,56 a	6,63 a	6,69 a
ISO46T1	5,09 a	5,43 a	6,33 a	6,39 a	6,46 a
ISO6T3	4,99 a	5,79 a	5,96 a	5,99 a	6,06 a
ISO117T1	4,29 b	4,89 b	5,53 b	5,89 a	5,93 a
ISO115T1	4,03 b	4,89 b	5,16 b	5,56 b	5,63 b
ISO3T4	5,13 a	5,59 a	5,93 a	5,99 a	6,06 a
ISO15T2	4,49 a	5,29 a	6,13 a	6,26 a	5,73 b
ISO8T2	4,53 a	5,43 a	5,53 b	5,96 a	6,03 a
ISO23T3	5,36 a	6,13 a	6,63 a	6,66 a	6,76 a
ISO2T2	5,06 a	5,63 a	6,29 a	6,32 a	6,43 a
ISO4T2	4,83 a	5,09 a	5,59 b	5,69 b	5,69 b
ISO80T2	3,49 a	3,69 b	5,09 b	5,16 b	5,36 b
ISO12T4	2,79 c	4,22 b	5,03 b	5,16 b	5,25 b
ISO53T1	5,26 a	6,43 a	6,93 a	6,96 a	6,98 a
ISO25T4	4,16 b	4,83 b	5,33 b	5,99 a	6,26 a
ISO17T3	3,39 b	4,26 b	4,86 b	5,06 b	5,19 b
ISO6T1	3,49 b	5,02 b	5,56 b	5,83 a	6,23 a
ISO47T1	2,73 c	3,69 b	4,93 b	4,99 b	5,06 b
ISO22T3	3,59 b	4,76 b	5,53 b	5,76 b	5,89 a
ISO30T2	2,50 c	4,09 b	4,53 b	4,96 b	5,29 b
ISO52T1	3,66 b	4,56 b	5,59 b	5,73 b	6,06 a
ISO7T1	1,46 c	2,03 c	2,53 c	2,59 c	2,76 c
ISO114T1	2,06 c	2,59 c	2,93 c	2,99 c	3,09 c
ISO52T2	1,56 c	2,36 c	2,46 c	2,53 c	2,62 c
Água	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
CV%	38,95	33,39	27,95	25,29	24,92

Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Escala de notas: 0 – sem sintomas; 1 – < 1% de área lesionada; 2 – 1,1 a 3%; 3 – 3,1 a 6%; 4 – 6,1 a 12%; 5 – 12,1 a 25%; 6 – 25,1 a 50%; e 7 – >50%.

Assim como nesse trabalho, Costa (2012) obteve resultados positivos com a inoculação de rizobactérias nesse mesmo patossistema. Entretanto, a severidade média, com base na escala de notas, observada em seu trabalho foi inferior, inclusive na testemunha, aproximadamente 3,5 contra 6,09 no presente estudo. Esse fato pode ter sido ocasionado pela diferença na resistência natural dos genótipos utilizados, visto que nesse trabalho foi avaliada a cultivar Santa Cruz Kada enquanto que no trabalho do referido autor foi a cultivar Yoshimatsu. Outro fator que pode ter propiciado essa diferença na severidade é o nível de agressividade dos isolados de *C. cassiicola* utilizados nas inoculações.

Nos resultados apresentados na tabela 23, verifica-se que nenhum isolado induziu resistência completa a *C. cassiicola*. Entretanto, os isolados ISO52T2, ISO7T1 e ISO114T1 induziram resistência proporcionando níveis médios de severidade de 39,04%, 39,51% e 42,82%, respectivamente, enquanto a testemunha apresentou média de 87,14%.

Nas curvas de progresso da doença (escala de notas) de cada tratamento, exceto as dos tratamentos com os isolados ISO7T1, ISO114T1, ISO30T2 e ISO52T2, a doença progrediu de forma acentuada até o 2º dia após a inoculação, provavelmente em função das condições adequadas de temperatura e umidade proporcionadas pela câmara úmida (Figura 19).

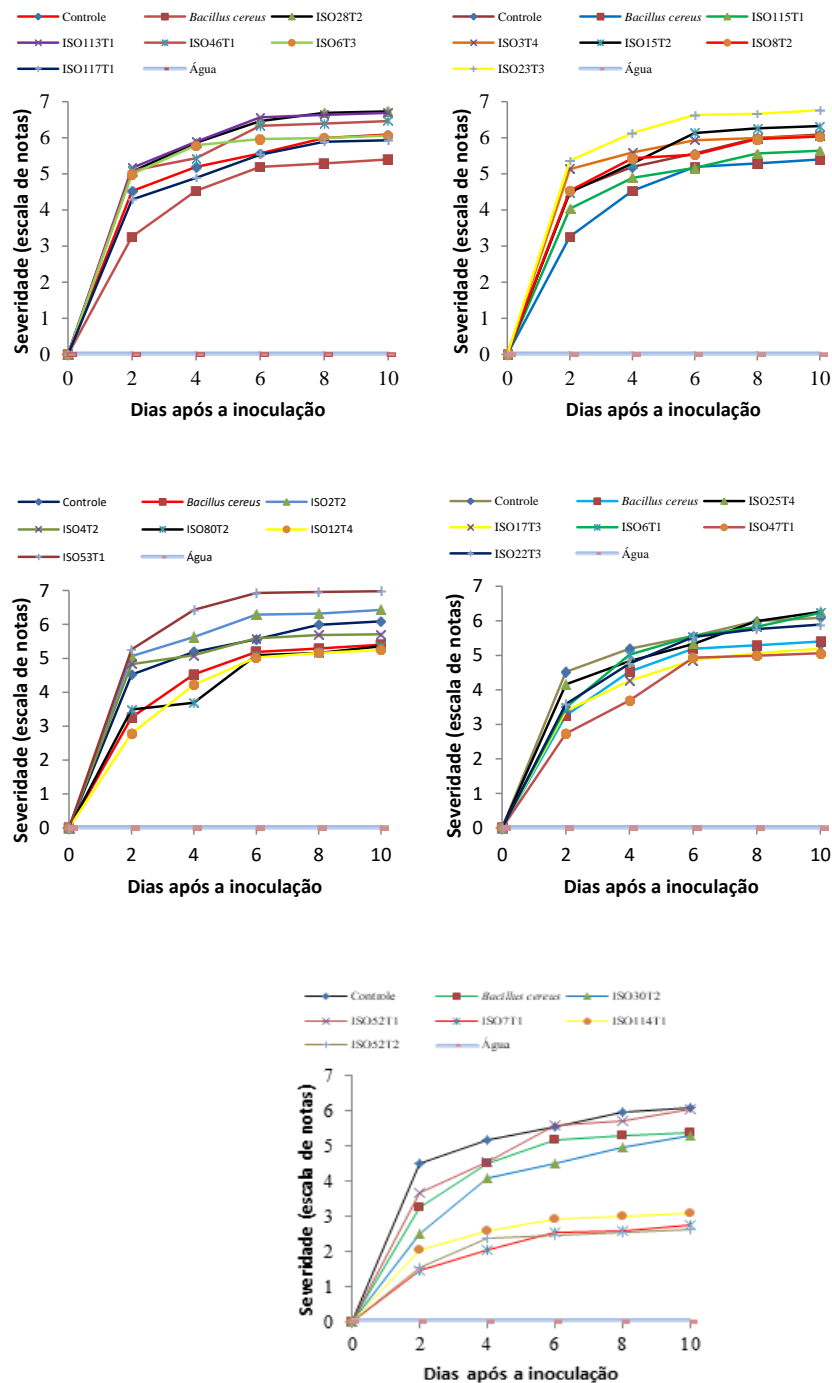


Figura 19. Curvas de progresso (escala de notas) da mancha-alvo em mudas de tomateiro cultivar Santa Cruz Kada, cujas sementes foram microbiolizadas com 25 isolados de rizobactérias em Manaus (AM), 2017. Escala de notas: 0 – sem sintomas; 1 - < 1% de área lesionada; 2 – 1,1 a 3%; 3 – 3,1 a 6%; 4 - 6,1 a 12%; 5 – 12,1 a 25%; 6 – 25,1 a 50%; e 7 - >50%.

Os dados da AACPD obtidos a partir da escala de notas corroborando os dados de severidade mostram que houve diferenças significativas entre os tratamentos com *B. cereus* (controle positivo), ISO7T1, ISO114T1 e ISO52T2 quando comparados ao controle negativo pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$) (Tabela 20).

Tabela 20. Valores médios da área abaixo da curva de progresso da mancha-alvo (AACPD), pela escala de notas (EN) em mudas de tomateiro cv. Santa Cruz Kada em Manaus (AM), 2017.

Tratamentos	AACPD
Controle	48,89 a
<i>Bacillus cereus</i>	41,99 b
ISO28T2	54,93 a
ISO113T1	55,23 a
ISO46T1	52,99 a
ISO6T3	51,59 a
ISO117T1	47,19 b
ISO115T1	44,96 b
ISO3T4	51,39 a
ISO15T2	50,72 a
ISO8T2	48,96 a
ISO23T3	56,36 a
ISO2T2	53,09 a
ISO4T2	48,03 a
ISO80T2	40,29 b
ISO12T4	39,73 b
ISO53T1	58,13 a
ISO25T4	46,93 b
ISO17T3	40,39 b
ISO6T1	46,09 b
ISO47T1	37,79 b
ISO22T3	45,23 b
ISO30T2	37,49 b
ISO52T1	45,19 b
ISO7T1	20,03 c
ISO114T1	24,29 c
ISO52T2	20,49 c
Água	0 d
CV%	21,96

Média de 10 repetições. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$). ¹Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) conforme escala de notas de 0 a 7 onde: 0 – sem sintomas; 1 – < 1% de área lesionada; 2 – 1,1 a 3%; 3 – 3,1 a 6%; 4 – 6,1 a 12%; 5 – 12,1 a 25%; 6 – 25,1 a 50%; e 7 – >50%.

Analisando separadamente o progresso da mancha-alvo e a porcentagem de proteção (%), referentes aos isolados ISO7T1, ISO114T1 e ISO52T2, os quais apresentaram os melhores resultados, observa-se que todos promoveram reduções significativas quando comparados ao controle negativo doença (Figuras 18 A, B e C). Com base nos dados da AACPD (escala de notas), os quais foram utilizados para os cálculos da % proteção da planta, verificou que as porcentagens de proteção promovidas pelos isolados variaram de 50,31 a 59,03% (Figura 20). Vale mencionar, que o controle positivo (*B. cereus* UFV 101) diferiu significativamente do controle negativo, apresentando, entretanto, redução de apenas 14,11% na severidade. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Mendonça (2006), em pesquisa visando selecionar bactérias com potencial de indução de resistência em feijoeiro, na qual foram testados

200 isolados bacterianos e apenas o isolado UFV-RP53 [*Pseudomonas putida* (Trevisan 1889) Migula 1895AL] reduziu significativamente a severidade da ferrugem [*Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger (sin. *U. phaseoli* (Reben) Wint.) em 43%.

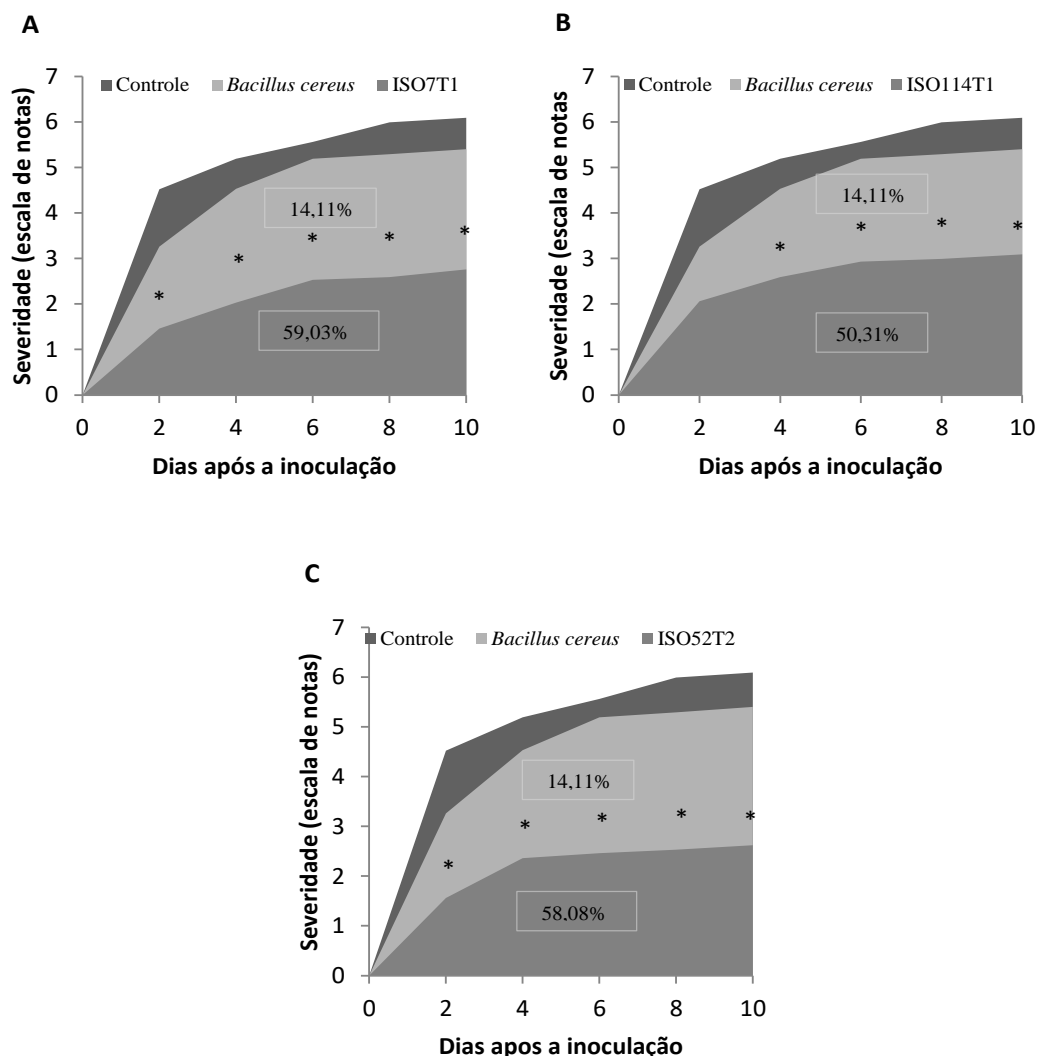


Fig. 20. Progresso da mancha-alvo e % de proteção (valores nas caixas) em tomateiro, cv. Santa Cruz Kada, cujas sementes foram microbiolizadas com os isolados ISO7T1 (19 A), ISO114T1 (19 B) e ISO52T2 (19 C) e com *Bacillus cereus* - UFV101. Asteriscos dentro de cada dia de avaliação representam valores diferentes entre tratamentos e controle, de acordo com o teste Scott-Knott a um nível de significância de 5%.

Em síntese, os isolados bacterianos que induziram resistência parcial à *C. cassicola* nesse trabalho pertencem aos gêneros *Bacillus* e *Lysinibacillus* conhecidos por suas habilidades em induzir resistência sistêmica em diversos patossistemas.

É importante salientar que os pressupostos para a ocorrência de indução de resistência foram atendidos, ou seja, a separação espacial entre o patógeno e o agente indutor (rizobactérias) caracterizando a sistemicidade desse mecanismo de resistência e o intervalo de tempo entre a aplicação do indutor e a inoculação do patógeno (20 dias).

Além disso, apesar dos meios pelos quais os isolados foram capazes de induzir resistência não terem sido objeto de estudo nesse trabalho, sabe-se que diversos são os mecanismos envolvidos na indução de resistência em plantas a patógenos, como por exemplo, acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese como as quitinases, peroxidases e β 1,3 – glucanases (Chakraborty *et al.* 2006), lignificação e formação de papilas (Van Loon *et al.* 1998). Shabanamol, *et al.* (2017), investigando o potencial de biocontrole in vivo de um isolado de *Lysinibacillus sphaericus* em condições de estufa, observaram que a aplicação foliar e no solo diminuiu significativamente a incidência da queima-das-bainhas em arroz (*Rhizoctonia solani* Kuhn), mencionando que a aplicação desse isolado em tratamentos únicos e combinados induz resistência sistêmica, a partir do acúmulo significativo de enzimas de defesa, como peróxidos, fenilalanina amônia-liase, além do aumento de compostos fenólicos. Conforme mencionado por Teixeira *et al.* (2005), estudos histológicos, bioquímicos e fisiológicos buscando detectar algumas dessas modificações nas plantas tratadas com os isolados de rizobactérias podem fornecer um maior embasamento para se explicar a expressão da resistência.

Considerando-se os dados obtidos, verifica-se que é possível minimizar a severidade da mancha-alvo do tomateiro utilizando RPCPs e, conseqüentemente, reduzir a necessidade de aplicação de defensivos químicos. Por mais que os isolados testados não tenham sido capazes de proporcionar alta resistência, podem servir como uma ferramenta a mais para o manejo integrado dessa doença. Por fim, vale mencionar que para se comprovar a estabilidade dos isolados devem-se realizar testes em condições de campo, pelos mesmos motivos expostos quanto à promoção de crescimento.

Quanto à influência da origem dos isolados sobre o potencial de indução de resistência, o teste exato de Fisher mostrou não haver relação entre origem dos isolados e capacidade de induzir resistência (Tabela 21). Portanto, os isolados pertencentes às 4 áreas de coleta referentes as doses 0, 40, 80 e 120 t ha⁻¹, respondem do mesmo modo ao teste de indução de resistência não havendo influência das doses de biocarvão sobre o resultado, ou seja, embora somente os isolados com origem nas áreas que receberam 0 e 40 t ha⁻¹ de biocarvão, tenham sido capazes de induzir resistência, estatisticamente não pode-se assumir que haja influência do local de origem sobre essa capacidade.

Tabela 21. Distribuição de frequência dos 25 isolados de rizobactérias quanto à indução de resistência (AACPD) a mancha-alvo, segundo a origem em Manaus (AM), 2017.

Doses da biocarvão (t ha ⁻¹)	Indução de resistência				Total
	Positivo		Negativo		
	N	%	N	%	
0	7	70	3	30	10 (40%)
40	3	37,5	5	62,5	8 (32%)
80	2	50	50	100	4 (16%)
120	2	0	1	100	3 (12%)
Total	14	56	11	44	25 (100%)

Estatística: p valor (Fisher) = 0,5537^{ns}.

Os dados obtidos quanto à distribuição dos isolados sugerem que além do biocarvão na dose mais elevada não ter apresentado efeito sobre a população de microrganismos capazes de promover o crescimento, também não selecionou comunidades bacterianas envolvidas na indução de resistência contra *C. asiicola* em plântulas de tomateiro.

6. CONCLUSÕES

A população de micro-organismos cultiváveis do solo na camada de 0-10 cm pode ser influenciada de forma positiva ou negativa dependendo da dose do biocarvão adicionado no solo. Os métodos utilizados, neste trabalho, para avaliação da colonização radicular se mostraram eficientes e se complementaram na interpretação dos resultados. As rizobactérias apresentaram potencial em promover crescimento e induzir resistência a *C. casicola* em plântulas de tomateiro. As doses de biocarvão influenciaram na seleção de bactérias com capacidade de colonizar o sistema radicular de plântulas de tomateiro e solubilizar fosfato de cálcio. No entanto, as doses não influenciaram na seleção de bactérias capazes de promover o crescimento, produzir ácido indol acético e induzir de resistência. O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA permitiu identificar os isolados em nível de gênero.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrofit. 2017. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso 12 Novembro 2017.
- Agrios, G. N. 2005. *Plant Pathology*. Elsevier. Academic Press. London, 922p.
- Ahmad, F.; Ahmad, I.; Khan, M. S. 2008. Screening of freeliving rhizospheric bacteria for their multiple plant growth- promoting activities. *Microbiological Research*, v.163, n.2, p. 173-181.
- Alves, M. L.; Lourd, M.; Noda, H. 1985. Ocorrência de *Corynespora cassiicola* em caráter epidêmico em tomates em Manaus – AM. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 18, Fortaleza. Resumos... Brasília: SBF, 1985. *Fitopatologia Brasileira*, v.10, n.2, p. 229.
- Anderson, C. R.; Hamonts, K.; Clough, T. J.; Condrón, L. M.; Fiers, M.; Stewart, A.; Hill, R. A.; Sherlock, R. R. 2011. Biochar induced soil microbial community change: Implications for biogeochemical cycling of carbon, nitrogen and phosphorus. *Pedobiologia*, Amsterdam, v.54, p. 309 – 320.
- Andrade, C. L. L. 2012. Silício e indutores de resistência no controle da pinta bacteriana do tomateiro e na atividade de enzimas de defesa. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife. 79f.: il.
- Andrade, S. P; Caniato, M. M. 2017. Seleção de rizobactérias através da técnica de visualização de zonas de turbidez. Anais iniciação científica. *Igapó*, v. 7: n. especial: p. 133, 2016/2017.
- Andrews, J. H. 1992. Biological control in ther phyllosphere. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.30, p.603-635.
- Araújo, F. F.; Guerreiro, R. T. 2010. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* promotores de crescimento de milho cultivado em solo autoclavado e natural. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 34, n. 4, p. 837-844. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141370542010000400007ng=en&nrm=iso>. Acesso em 04 Dez. 2017.
- Araújo, F. F.; Menezes, D. 2009. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e abiótico (Acibenzolar-S-Metil). *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v.35, n.3, p.169-172.
- Araújo, F. F.; Hungria, M.; Henning, A. A. 2005. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean

root development. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.21, n.8/9, p.1639-1645.

Ashraf, M. A.; Rassol, M.; Mirza, M. S. 2011. Nitrogen fixation and indol acetic acid production potential of bacteria isolated from rhizosphere of sugarcane. *Advances in Biological Research*, Dubai, v. 5, p. 348-355.

Atkinson, C. J.; Fitzgerald, J. D.; Higgs, N. A. 2010. Potential mechanisms for achieving agricultural benefits from biochar application to temperate soils: a review. *Plant and Soil*, v.337, n.1-2, p.1-18.

Austim, A. T.; Ballarè, C. L. 2014. Plant interactions with other organisms: molecules, ecology and evolution. *New Phytologist*, v.204, p.257–260.

Barbosa, R. N. T. 2009. Seleção de rizobactérias visando controle biológico da murcha-de-esclerócio em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) Dissertação (mestrado) – programa de pos graduação em agronomia – Posagro, Universidade Federal de Roraima, Boa vista, 44f.: il.

Barea, J. M.; Pozo, M. J.; Azcon, R.; Azcon-Aguilar, C. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, v.56, p.1761-1778.

Barroti, G.; Nahas, E. 2000. População microbiana total e solubilizadora de fosfato em solo submetido a diferentes sistemas de cultivo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.35, n.10, p.2043-2050.

Bashan, Y.; de-Bashan, L. E. 2005. Plant Growth-Promoting. In: HILLEL, D. (ed.), *Encyclopedia of Soils in the Environment*. 1a. ed. Oxford: Elsevier, p.103-115.

Batista, B. D. 2017. Promoção de crescimento vegetal por *Bacillus* sp. RZ2MS9: dos genes ao campo. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 107 p. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11137/tde-15082017-170543/>>. Acesso em: 05/12/2017.

Benhamou, N.; Nicole, M. 1999. Cell biology of plant immunization against microbial infection: The potential of induced resistance in controlling plant diseases. *Plant Physiology Biochemistry*, v.37, n.10, p.703–719.

Benites, V. M.; Mendonça, E. S.; Schaefer, C. E. G. R.; Novotny, E. H.; Reis, E. L.; Ker, J. C. 2005. Properties of black soil humic acids from high altitude rocky complexes in Brazil. *Geoderma*, v.127, n.1-2, p.104-113.

Bernardes, F. S.; Patricio, F. R. A.; Santos, A. S.; Freitas, S. 2010. Indução de resistência sistêmica por rizobactérias em cultivos hidropônicos. *Summa Phytopathologica*, v.36, n.2, p.115-121.

- Berry, C., 2012. The bacterium, *Lysinibacillus sphaericus*, as an insect pathogen. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.09, p.1–10.
- Blazquez, C. H. 1972. Target spot of tomato. *Plant Disease Reporter*, v.56, p. 243- 245.
- Blazquez, C. H. 1991. Target spot. In: JONES, J. B.; JONES, J. P.; STALL, R. E.; ZITTER, T. A. (Ed.). *Compendium of tomato diseases*. St. Paul: *American Phytopathological Society Press*, p.23.
- Brady, N. C.; Weil, R. R., 2012. *Elementos da natureza e propriedades dos solos*. 3. ed. Porto Alegre: *Bookman*, p.716.
- Bric, J. M.; Bostock, R. M.; Silverstone, S. E. 1991. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, v.57, p.535-538.
- Bringel, J. M. M. 1997. Colonização de raízes de plantas cultivadas por *Pseudomonas solanacearum* biovars 1, 2 e 3 em condições de casa de vegetação e in vitro. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, 122pp.
- Campbell, R., Greaves, M. P. 1990. *Anatomy and community structure of the rhizosphere*. In: Lynch J.M., (eds.) John Wiley e Sons, p.11–34.
- Campos, J. T., 2010. *Rizobactérias promotoras de crescimento em cana de açúcar*. Dissertação de mestrado. Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), 59pp.
- Campos, M. A. A.; Uchida, T. 2002. Influência do sombreamento no crescimento de mudas de três espécies amazônicas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 37, n.3, p.281-288.
- Carvalho, J. L.; Pagliuca, L. G. 2007. Tomate: Um mercado que não pára de crescer globalmente. In: *Revista Hortifruti Brasil*, v.6, n.58, p.6-14.
- Cerkauskas, R. 2005. Tomato Diseases - Target Spot. *Asian Vegetable Research and Development Center Report*, AVRDC Publication 05-638, 2p.
- Chakraborty, U., Chakraborty, B. N., Basnet, M. 2006. Plant growth promotion and induction of resistance in *Camellia sinensis* by *Bacillus megaterium*. *Journal of Basic Microbiology*, v.46, p.186-195.
- Chanway, C. P.; Turkington, R.; Holl, F. B. 1991. Ecological implications of specificity between plants and rhizosphere microorganisms. *Advances in Ecological Research*, v.21, p.121-169.
- Chen, J.; Liu, X.; Zheng, J.; Zhang, B.; Lu, H.; Chi, Z.; Pan, G.; LI, L.; Zheng, J.; Zhang, X.; Wang, J.; Yu, X. 2013. Biochar soil amendment increased bacterial but decreased fungal gene abundance with shifts in community structure in a slightly acid rice paddy from Southwest China. *Applied Soil Ecology*, v.71, n.0, p. 33-44.

Coelho Netto, R. A.; Noda, H.; Assis, L. A. G.; Machado, F. M. 2012. Avaliação de práticas de manejo da mancha-de-*Corynespora* na cultura do tomate. *Tropical Plant Pathology*, v. 37, n.3, p.3185-190.

Costa, I. B. 2012. Avaliação de rizobactérias de solo antrópico, na promoção de crescimento e na indução de resistência contra mancha-alvo do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) / Igor Bahia Costa.--- Manaus : [s.n.], 2012. x, 49 f.: il.

Cutrim, F. A.; Silva, G. S. 2003. Patogenicidade de *Corynespora cassiicola* a diferentes espécies de plantas. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, DF, v.28, n.2, p.193-194.

Damasceno, J. C. A. 2011. Actinobactérias na promoção de crescimento e controle de *Meloidogyne javanica* em mudas de tomateiro. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Cruz das Almas-Ba, 95f.; il.

Danhor, T.; Fuqua, C. 2007. Biofilm formation by plant-associated bactéria. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, v.61, p.401-422.

Dashti, N.; Zhang, F.; Hynes, R.; Smith, D. L. 1998. Plant growth promoting rhizobacteria accelerate nodulation and increase nitrogen fixation activity by field grown soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] under short season conditions. **Plant and Soil**, v.200, n.2, p.205-213.

Dobbelaere, S.; Vanderleyden, J. Okon, Y. 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*, Boca Raton, v.22, n.2, p.107-149.

Duarte, M.L.R.; Asano, S.; Albuquerque, F.C. 1983. Estudos comparativos das características morfológicas e fisiológicas de dois isolamentos de *Corynespora cassiicola*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.8, n.2, p.205-214.

Durenkamp, M.; Luo, Y.; Brookes, P. C. 2010. Impact of black carbon addition to soil on the determination of soil microbial biomass by fumigation extraction. *Soil Biology and Biochemistry*, v.42, n.11, p.2026-2029.

Durrant, W. E.; Dong, X. 2004. Systemic Acquired Resistance. *Annual Review of Phytopathology*, v.42, n.2, p.185-209.

Egamberdieva, D., Wirth, S., Behrendt, U., Abd-Allah, E.F., and Berg, G. 2016. Biochar treatment resulted in a combined effect on soybean growth promotion and a shift in plant growth promoting rhizobacteria. *Frontiers in Microbiology*, v.7, p.209.

Ellis, M. B.; Holliday, P. 1971. *Corynespora cassiicola*. Kew, UK: Commonwealth Mycological Institute. In: CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, v.303, 2pp.

Ferreira, J. B.; Nascimento, G. O.; Neves, Y. Y. B.; Gomes, F. A.; Nascimento, L. O. 2012. Levantamento de doenças e avaliação da incidência e severidade da mancha

branca (*Cercospora caribaea*) em mandiocais na região do Alto Juruá, Acre. *Enciclopédia biosfera*, v. 8, p.712-723.

Filgueira, F. A. R. 2000. *Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças*. 3 ed: Viçosa: UFV, 421pp.

Faostat - Food and Agriculture Organization of The United States. 2015. Statistics Division (Production). Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>> Acesso em: 25/10/2015.

Freitas, S. S.; Melo, A. M. T.; Donzeli, V. P. 2003. Promoção de crescimento de alface por rizobactérias. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.27, n.1, p.61-70.

Freitas, S. S.; Vildoso, C. I. 2004. Aguilar. Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 28, n. 6, p. 987-994. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-06832004000600007&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 04 de setembro de 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832004000600007>.

Freitas, S. S. 2007. *Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas*. In: Silveira, A. P. D. e Freitas, S. S. *Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental*. Campinas: Instituto Agrônômico, 312pp.

Glick, B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, v.41, n.1, p.109-117.

Goiás. 2005. Secretaria de Estado de Agricultura e Abastecimento do Estado de Goiás. Superintendência de Planejamento Agrícola (Supla). *Informações estatísticas agropecuárias de Goiás*. Goiânia: Secretaria da Agricultura/Divisão de Estatística.

González, T. O. 2008. Caracterização, diversidade genética e nodulação em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) de isolados de rizóbios do Brasil e da Venezuela. Tese (Doutorado em Produção Vegetal). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 72f.

Graber, E. R.; Harel, Y. M.; Kolton, M.; Cytryn, E.; Silber, A. David, D. R.; Tsechansky, L; Borenshtein, M; Elad, Y. 2010. Biochar impact on development and productivity of pepper and tomato grown in fertigated soilless media. *Plant Soil*, v.337, n.1, p.481-496.

Guidi, V.; Lehner, A.; Lüthy, P.; Tonolla, M. 2013. Dynamics of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis and *Lysinibacillus sphaericus* spores in urban catch basins after simultaneous application against mosquito larvae. *PLOS ONE* 8:e55658. doi: 10.1371/journal.pone.0055658

Hale, L.; Luth, M.; Kenney, R.; Crowley, D. 2014. Evaluation of pinewood biochar as a carrier of bacterial strain *Enterobacter cloacae* UW5 for soil inoculation. *Applied Soil Ecology*, v.84, p.192-199.

Hammerschmidt, R.; Kuc, J. 1982. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. *Physiology of Plant Pathology*, Berlin, v.20, n.1, p.61-71.

Hara, F. A. S.; Oliveira, L. A. 2004. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. *Acta Amazônica*, v.34, n.3, p.343-357.

Harthmann, O. E. L.; Mogor, A. F.; Wordell Filho, J. A.; Luz, W. C. 2009. Rizobactérias no crescimento e na produtividade da cebola. *Cienc. Rural* [online]. 2010, vol.40, n.2 [cited 2018-01-07], pp.432-435. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010384782010000200033&lng=en&nrm=iso. Acesso em 30/12/2017.

Heil, M.; Bostock, M. R. 2002. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defenses. *Annals of Botany*, London, v.89, n.5, p.503-512.

Hernández, A. 2000. Características de géneros asociados a los cultivos de gerbera y clavel. *Cultivos Tropicales*, Havana, v.21, n.3, p.15-18.

Ibge - Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. 2013. *Levantamento sistemático da produção agrícola*. <Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatística/indicadores/agropecuária>>. Acesso em 13 de novembro de 2015.

Janda, J. M.; Abbott, S. L. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol* 45:2761-2764.

Jemba, P. K.; Alexander, M. 1999. Possible determinants of rhizosphere competence of bacteria. *Soil Biology e Biochemistry*, v.31, n.4, p.623-632.

Jeun, Y. C.; Park, K. S.; Kim, C.H.; Fowler, W. D.; Kloepper, J. W. 2004. Cytological observations of cucumber plants during induced resistance elicited by rhizobacteria. *Biological control*, v.29, p.34-42.

Jones, J. B.; Jones, J. P.; Stall, R.; Zitter, T. A. 1991. Compendium of tomato diseases. St. Paul, Minnessota: *APS Press*, 73pp.

Jones, L., Rousk, J., Edwards-Jones, G., DeLuca, H., Murphy, V. 2012. Biochar-mediated changes in soil quality and plant growth in a three-year field trial. *Soil Biology and Biochemistry*, v.45, p.113-124.

Joseph, B.; Patra, R. R., Lawrence, R. 2007. Characterization of plant growth promoting Rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L). *International Journal of Plant Production*, v.1, n.2, p.141-152.

Karuppiah, P.; Rajaram, S. 2011. Exploring the Potential of Chromium Reducing *Bacillus* sp. and there Plant Growth Promoting Activities. *Journal of Microbiology Research*, v.1, n.1, p.17-23.

Katoh, K.; Rozewicki, J.; Yamada, K. D. 2017. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinform.* [https://doi: 10.1093/bib/bbx108](https://doi.org/10.1093/bib/bbx108)

Katznelson, H.; Bose, B. 1959. Metabolic activity and phosphate-dissolving capability of bacterial isolates from wheat root, rhizosphere and non-rhizosphere soil. *Canadian Journal of Microbiology*, v.5, n.1, p.79-85.

Kennedy, A. C. 2005. *Rhizosphere*, in: Principles and Applications of Soil Microbiology, D.M., Sylvia, J.J., Fuhrmann, P.G., Hartel, and D.A., Zuberer, eds., 2nd ed. Pearson, Prentice Hall, New Jersey, p.242-262.

Kessler, A.; Baldwin, I. T. 2002. Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis. *Annual Review of Plant Biology*, v.53, n.1, p.299–328.

Kloepper, J. W. 2003. A review of mechanisms for plant growth promotion by PGPR, in: Abstracts and short papers. 6th International PGPR workshop, 5-10 october 2003, M.S., Reddy, M., Anandaraj, S.J., Eapen, Y.R., Sarma and J.W., Kloepper, eds., *Indian Institute of Spices Research*, Calicut, India, p.81-92.

Kloepper, J. W.; Schroth, M. N. 1981. Plant growth-promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. *Phytopathology*, v.71, p.642-644.

Kolton, M.; Harel, Y. M.; Pasternak, Z.; Graber, E. R.; Elad, Y.; Cytrun, E. 2011. Impact of biochar application to soil on the root-associated bacterial community structure of fully developed greenhouse pepper plants. *Applied e Environmental Microbiology*, v.77, n.14, p.4924-4930.

Krull, E. S., Lehmann, J. Skjemstad, J.; Baldock, J. 2008. The global extent of black C in soils; is it everywhere? In: Hans G. Schroder (ed.), *Grasslands; ecology, management and restoration*. New York: *Nova Science Publishers*, Inc. p.13–17.

Kurozawa, C.; Pavan, M. A. 1997. Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A.; Rezende, J.A.M., 1997. (Eds.). *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. 3.ed. São Paulo: Ceres, v.2, p.690-719.

Kurt, S. 2005. Genetic variation in *Corynespora cassiicola*, the Target Leaf Spot Pathogen. Pakistan, *Journal of Biological Sciences*, v.8, n.4, p.618-621.

Kwon, M. K.; Kang, B. R.; Cho, B. H.; Kim, Y. C. 2003. Occurrence of target leaf spot disease caused by *Corynespora cassiicola* on cucumber in Korea. *Plant Pathology*, Oxford, v.52, n.3, p.424.

Lazzaretti, E.; Melo, I. S. 2005. Influência de *Bacillus subtilis* na promoção de crescimento de plantas e nodulação de raízes de feijoeiro. Jaguariuna: Embrapa. Meio Ambiente, 21pp.

Lehmann, J.; Joseph, S. 2009. *Biochar for Environmental Management*, p. 1-5.

- Leite, M. C. B. S. 2012. *Bactérias halotolerantes associadas a plantas de cana-de-açúcar em solos da zona da mata de Pernambuco*. (Dissertação de Mestrado), Garanhuns, 91 f.
- Liang, B.; Lehmann, J.; Solomon, D.; Kinyangi, J.; Grossman, J.; O'Neill, B.; Skjemstad, J. O.; Thies, J.; Luizão, F. J.; Petersen, J.; Neves, E. G. 2006. Black carbon increases cation exchange capacity in soils. *Soil Science Society of American Journal*, v.70, p.1719-1730.
- Liu, Y., Lai, Q., Dong, C., Sun, F., Wang, L., Li, G.; Shao, Z. 2013. Phylogenetic diversity of the *Bacillus pumilus* group and the marine ecotype revealed by Multilocus Sequence Analysis. *PLoS One* 8, e80097.
- Lopes, C. A., Reis, A.; Boiteux, L. S. 2005. Doenças fúngicas. In: Lopes, C. A.; Ávila, A. C. (Ed.). *Doenças do tomateiro*. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, p.17-52.
- Lucy, M.; Reed, E.; Glick, B. R. 2004, Applications of free living plant growth promoting rhizobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v.86, n.1, p.1-25.
- Lynch, J. M. 1990. *The Rhizosphere*. John Wiley e Sons Ltd, Chichester, 458pp.
- Maia, C. M. B. F.; Madari, B. E.; Novotny, E. H. 2011. Advances in biochar research in Brazil. *Dynamic Soil, Dynamic Plant*, v.5, n.1, p.53-58.
- Mafia, R. G., Alfenas, A. C., Maffia, L. A., Ferreira, E. M., Binoti, D. H. B., Siqueira, L. 2009. Microbiolização e interação entre rizobactérias promotoras do crescimento e clones de eucalipto. *Revista Árvore*, Viçosa, v.35, n.5, p.789-797.
- Martinez, S. A.; Dussán, J. 2017. *Lysinibacillus sphaericus* plant growth promoter and lead phytoremediation enhancer with *Canavalia ensiformis*. Documento de grado, Universidad de los Andes, Bogotá.
- Masiello, C. A.; Chen, Y.; Gao, X.; Liu, S.; Cheng, H-Y.; Bennett, M. R. (2013). Biochar and microbial signaling: production conditions determine effects on microbial communication. *Environmental Science & Technology*, v.47, p.11496–11503.
- Mayak, S.; Tirosh, T.; Glick, B. R. 1999. Effect of wild-type and mutant plant growth-promoting rhizobacteria on the rooting of mung bean cuttings, *Journal of Plant Growth Regulation*, v.18, n.2, p.49–53.
- Mcdowell, J. M.; Dangl, J. L. 2000. Signal transduction in the plant immune response. *Trends Biochemical Sciences*, v.25, n.2, p.79–82.
- Mena-Violante, H.G.; Olalde-Portugal, V. 2007. Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. *Scientia Horticulturae*, v.113, n.1, p.103-106.

Mendonça, H. L. de. 2006. Seleção de rizobactérias como promotoras de crescimento e indutoras de resistência sistêmica em feijoeiro. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 67p.

Métraux, J-P.; Nawrath, C.; Genoud, T. 2002. Systemic acquired resistance. *Euphytica* v.124, p.237-243.

Minami, K.; Haag, H. P. 1989. O Tomateiro, 2º ed. rev. Campinas-SP, Fundação Cargill, il: 397pp.

Minami, K. 1995. Produção de mudas de alta qualidade em horticultura. Fundação Salim Farah Maluf, TA Queiroz Ed. São apulo, 132p.

Miranda, E. F. O. 1997. Colonização de raízes de plantas daninhas por *Ralstonia solanacearum* “in vitro” em casa de vegetação. Master Dissertation, Depto. Fitopatologia, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF – Brasil, 114f.

Moreira, F. M. S.; Siqueira, J. 2006. A Microbiologia e Bioquímica do Solo. Lavras: Editora UFLA, 626pp.

Naika, S.; Jeude, J. V. L.; Goffau, M.; Hilmi, M.; Dam, B. V. 2006. A Cultura do tomate. *Agrodok 17*. Fundação Agromisa e CTA, Wageningen, 104pp.

Nandakumar, R.; Babua, S.; Viswanathanb, R.; Raguchandera, T.; Samiyappana, R. 2001. Induction of sustemic resistence in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas flourescens*. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v. 33, n.4-5, p.603-612.

Nandal, M.; Hooda, R. 2013. Plant growth promoting rhizobacteria: A review article. *International Journal of Current Research*, v.5, n.12, p.3863-3871.

Naureen, Z, Rehman, N. U, Hussain, H, Hussain, J, Gilani, S. A, Al Housni, S.K; Mabood F, Khan AL, Farooq S, Abbas G, Harrasi, A. A. 2017. Exploring the Potentials of *Lysinibacillus sphaericus* ZA9 for Plant Growth Promotion and Biocontrol Activities against Phytopathogenic Fungi. *Frontiers in microbiology*, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.01477. e Collection 2017.

Nikoo, F. S.; Sahebani, N.; Aminian, H.; Mokhtarnejad, L. Ghaderi, R. 2014. Induction of systemic resistance and defense-related enzymes in tomato plants using *Pseudomonas fluorescens* CHAO and salicylic acid against root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Journal of Plant Protection Research*, v.54, n.4, p.383.

Nóbrega, I. P. C. 2011. Efeitos do Biochar nas propriedades físicas e químicas do solo: - Sequestro de carbono no solo. Dissertação de Mestrado em Engenharia do Ambiente – Universidade Técnica de Lisboa, 46pp.

Oliveira, A. L. M.; Canuto, E. L.; Urquiaga, S.; Reis, V. M.; Baldani, J. I. 2006. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria, *Plant and Soil*, v.284, n.1-2, p.23–32.

- Okinaka, R. T., Keim, P. 2016. The phylogeny of *Bacillus cereus* sensu lato. *Microbiology Spectrum*, feb. 4(1). doi: 10.1128/microbiolspec.TBS-0012-2012.
- O'Neill, B., Grossman, J., Tsai, M. T., Gomes, J. E., Lehmann, J., Peterson, J., Neves, E., Thies, J. E. 2009. Bacterial community composition in Brazilian Anthrosols and adjacent soils characterized using culturing and molecular identification. *Microbial Ecology*, v.58, n.1, p.23-35.
- Ortiz-Castro, R., Valencia-Cantero, E.; López-Bucio, J. 2008. Plant Growth Promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling. *Plant Signaling and Behavior*, 3, 263-265. <https://doi.org/10.4161/psb.3.4.5204>.
- Oteino, N.; Lally, R. D.; Kiwanuka, S. Loyd, A.; Ryan, D.; Germaine, K. J. 2015. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in microbiology*, v.6, p.745. 10.3389/fmicb.2015.00745.
- Padilha, F. J. Caracterização física, química e espectroscópica do biocarvão em Latossolo Amarelo distrófico da Amazônia Central. Dissertação (Mestrado). Manaus: [s.n.], 2017, xii, 53 f.: il.
- Pascholati, S. F.; Leite, B. 1995. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: Bergamin Filho, A. et al. (Ed.). Manual de Fitopatologia - Princípios e conceitos. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, p.417-454.
- PBMH. Programa Brasileiro para Modernização da Horticultura. (2003). Normas de Classificação do Tomate. Centro de Qualidade em Horticultura - CQH/ CEAGESP. São Paulo (CQH. Documentos, 26).
- Peixoto, C. P. 2011. Curso de Fisiologia Vegetal. Cruz das Almas, UFRB. 177pp.
- Pelzer, G. Q. 2010. Mecanismo de controle da murcha-de-esclerócio e promoção de crescimento em tomateiro mediados por rizobactérias. 2010. 64f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Roraima, Boa Vista.
- Pernezny, K.; Simone, G. W. 1999. Target spot of several vegetable crops. *Plant Pathology Fact Sheet*, Florida, p.39-43.
- Petti C. A. 2007. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clinical Infectious Disease*. v.44, n.8, p.1108-1114.
- Picanço, M. C.; Paula, S. V.; Moraes Júnior, A. R.; Oliveira, I. R.; Semeão, S. S.; Rosado, J. F. 2004. Impactos financeiros da adoção de manejo integrado de pragas na cultura do tomateiro. *Acta Scientiarum Agronomy*, Maringá, v.26, n.2, p.245-252.
- Pidello, A. 2003. The effect of *Pseudomonas fluorescens* strains varying in pyoverdine production on the soil redox status. *Plant Soil*, v.253, p.373-379.
- Pieterse, C. M. J.; Van Wees, S. C. M.; Van Pelt, J. A.; Knoester, M.; Laan, R.; Gerrits, H.; Weisbeek, P. J.; Van Loon, L. C. 1998. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, v.10, n.9, p.1571–1580.

Pires, F. R.; Souza, C. M.; Cecon, P. R.; Santos, J.B.; Tótola, M. R.; Procópio, S. O.; SILVA, A.A.; Silva, C. S. W. 2005. Inferências sobre atividade rizosférica de espécies com potencial para fitorremediação do herbicida tebuthiuron. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 29, n. 4, p. 627-634. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbcs/v29n4/26111.pdf>>. Acesso em: 08 out. 2017. doi: 10.1590/S0100.

RAAIJMAKERS, J. M.; Paulitz, T. C.; Steinberg, C.; Alabouvette, C.; Moëgne-Loccoz, Y. 2009. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil*, v.321, n.2, p.341-361.

Rambaut, A. 2009. Tracer 1.5. Disponível em<<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>> Acesso em 30 junho 2018.

RATHORE, P. (2014). Research article a review on approaches to develop plant growth promoting rhizobacteria. *International Journal of Recent Scientific Research*, v.5, n.2, p.403-407.

Reis, A.; Boiteux, L. S. 2007. Mancha-de-corinéspora do tomateiro. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças (Comunicado Técnico, 41), 6pp.

Rodríguez, H.; Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, v.17, p.319-339.

Romeiro, R. S. 1999. Indução de Resistência em plantas a patógenos. Viçosa, UFV. *Cadernos didáticos*, 56pp.

Romeiro, R. S. 2007. Controle biológico de doenças de plantas – Fundamentos. Viçosa - MG: UFV, 296pp.

Romeiro, R. S.; Lanna Filho, R.; Macagnan, D.; Garcia, F. A. O.; Silva, H. S. A. 2010. Evidence that the biocontrol agent *Bacillus cereus* synthesizes protein. *Tropical Plant Pathology*, v.35, n.1, p.11-015.

Rondon, M. A.; Lehmann, J.; Ramírez, J.; Hurtado, M. 2007. Biological nitrogen fixation by common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) increases with biochar additions. *Biology Fertility Soils*, v.43, n.6, p.699-708.

Ryals, J. A.; Neuenschwander, U. H.; Willits, M. G; Molina, A.; Steiner, H-Y.; Hunt, M. D. 1996. Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, v.8, n.10, p.1809-1819.

Santos, I. P.; Verzignassi, J. R. ; Benchimol, R. L. ; Cardoso, S. S. ; Poltronieri, L. S. 2007. Ocorrência de mancha alva, causada por *Corynespora cassiicola*, em alface cultivado em hidroponia no Brasil. *Summa Phytopathologica.*, Botucatu, v.33, n.4, p.419.

Santos, J. L. S.; Madari, B. E.; Petter, F. A.; Borges, C. V.; Mendes, L. W.; Tsai, S. M. 2013. Efeito do biocarvão na estrutura de comunidades bacterianas no solo e sistema radicular de soja (*Glycine max* L.). (Apresentação de Trabalho/Congresso).

- Shabanamol, S; Sreekumar, J; Jisha, M. S. 2017. Bioprospecting endophytic diazotrophic *Lysinibacillus sphaericus* as biocontrol agents of rice sheath blight disease. *3 Biotech*, v.7, n.5, p.337. doi: 10.1007/s13205-017-0956-6. Epub 2017 Sep 20.
- Saharan, B. S.; Nehra, V. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sciences and Medicine Research*, v.2011, n.21, 30pp.
- Skjemstad, J. O.; Reicosky, D. C.; Wills, A. R.; McGowan, J.A. 2002. Charcoal carbon in U.S. agricultural soils. *Soil Science Society of America Journal*, v.66, n.4, p.1249–1255.
- Siddiqui, A. R., S.; Nazeer, M. A.; Piracha, M. M.; Saleem, I.; Siddiqui, S. M. Shahzad, and G. Sarwar. 2016. The production of biochar and its possible effects on soil properties and phosphate solubilizing bacteria. *Journal of Applied Agriculture and Biotechnology*, v.1, n.1, p.27-40.
- Silva, J.B.C.; Giordano, L.B. 2000. *Produção mundial e nacional*. In: Silva, J.B.C. Giordano, L.B. Tomate para processamento Industrial. Brasília: Comunicação para transferência de tecnologia/Embrapa Hortaliças, p.8-11.
- Silva, W.P; Multani, D. S.; Deverall, B. J.; Lyon, B. R. 1995. RFLP and RAPD analyses in the identification and differentiation of isolates of the leaf spot fungus *Corynespora cassiicola*. *Australian Journal of Botany*, v.43, n.3, p.609-618.
- Silva, G. S.; Rodrigues, A. A. C.; Soares Júnior, A. C. 1997. Mancha de *Corynespora* em acerola (*Malpighia glabra*). *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, DF, v.22, n.3, p.452.
- Silva, H. S. A.; Romeiro, R. S.; Carrer Filho, R.; Pereira, J. L. A.; Mizubuti, E. S. G.; Mounter, A. 2004. Induction of systemic resistance by *Bacillus cereus* against tomato foliar diseases under field conditions. *Journal of Phytopathology*, Berlin, v.152, n.6, p.371-375.
- Silva, E. R. 2011. Exsudação radicular e sua utilização por rizobactérias. 2011. Dissertação (mestrado em Gestão de recursos agroambientais). Faculdade de agricultura tropical e subtropical, Instituto Agrônomo, Campinas, 23 f.
- Silva, R. R.; Rodrigues, L. U.; Freitas, G. A.; Melo, A.V.; Nascimento, I.R.; D'Andréa, A. F. 2012. Influência de casca de arroz carbonizada em diferentes substratos na qualidade de mudas de tomateiro. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, Recife, v.7, p.803-809.
- Sylvester-Bradley, R.; Asakawa, N.; La Torraca, S.; Magalhães, F. M. M.; Oliveira, L.; Pereira, R. M. 1982. Levantamento quantitativo de micro-organismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. *Acta Amazônica*, Manaus, v.12, n.1, p.15-22.

- Smalla, K.; Sessitsch, A.; Hartmann, A. 2006. The rhizosphere: soil compartment influenced by the root. *Federation of European Microbiology Society*, v.56, n.2, p.165.
- Smith, C. J. 1996. Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. *The New Phytologist*, v.132, n.1, p.1-45.
- Sneath, P. H. A.; Sokal, R. R. 1973. *Numerical taxonomy*. San Francisco, W. F. Freeman and Company, San Francisco, p.230-234.
- Sottero, A. N.; Freitas, S. S.; Melo, A. M. T.; Trani, P. E. 2006. Rizobactérias e alface: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.30, n.2, p.225-234.
- Souza, M. O. 2011 Caracterização fenotípica e molecular de *Bacillus* sp. e gêneros relacionados provenientes de análises de produtos farmacêuticos / Mariana de Oliveira Souza – Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 161 f.: il.
- Spaepen, S. 2015. *Plant hormones produced by microbes*, in *Principles of Plant-Microbe Interactions*. ed Lugtenberg B., editor. (Basel: Springer International Publishing AG.), 247–256.
- Spokas, K. A; Baker, J. M; Reicosky, D. C. 2010. Ethylene: potential key for biochar amendment impacts. *Plant and Soil*, v.333, n.1-2, p.443–452.
- Steiner, U; Schönbeck, F. 1995. *Induced disease resistance in monocots*. In: HAMMERSCHMIDT, R.; KÚC, J. (Eds.) *Induced Resistance to Disease in Plants*. Kluwer. Dordrecht, v.4, p.86-110.
- Sticher, L.; Mauch-Mani, B.; Métraux, J. P. 1997. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, v.35, n.1, p.235- 270.
- Suslow, T. V. 1982. Role of root colonizing bacteria in plant growth. In: MOUNT, M.S. e LARY, G.H., eds. *Phytopathogenic Prokaryotes*. London, *Academic Press*, v.2, p.187-223.
- Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A.; Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Bio Evol* v.30, p.2725-2729.
- Teixeira, D. A., Alfenas, A. C., Mafia, R. G., Maffia, L. A.; Ferreira, E. M. 2005. Evidências de indução de resistência sistêmica à ferrugem do eucalipto mediada por rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. *Fitopatologia Brasileira*, v.30, n.4, p.350-356.
- Trazzi, P. A. 2014. Uso do biocarvão na produção de mudas e no crescimento inicial de *Pinus taeda* L. Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias. 117 f.: il. Disponível em: <http://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/37925/R%20-%20T%20%20PAULO%20ANDRE%20TRAZZI.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em : 12 de outubro de 2016.

- Vallad, G. E.; Goodman, R. M. 2004. Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture. *Crop Science Society of America*, Madison, v.4, n.6, p.1920-1934.
- Van Loon, L. C.; Bakker, P. A. H. M.; Pieterse, C. M. J. 1997. *Mechanisms of PGPR-induced resistance against pathogens*. In: Proceedings of fourth international workshop on plant-growth-promoting rhizobacteria. Sapporo, Japan, p.50-57.
- Van Loon, L. C.; Bakker, P. A. H. M.; Pieterse, C. M. J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria, *Annual Review of Phytopathology*, v.36, n.1, p.453–483.
- Verzignassi, J. R.; Vida, J.B.; Tessmam, D. J. 2003. *Corynespora cassiicola* causando epidemias de manchas foliares em pepino 'japonês' sob estufa no norte do Paraná. *Fitopatologia Brasileira*, v.28, n.5, p.570.
- Vessey, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v.255, n.2, p.571-586.
- Vyas, P.; Gulati, A. 2009. Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. *BMC Microbiology*, v.22, p.9:174.
- Walker, T. S., Bais, H. P., Grotewold, E., Vivanco, J. M. 2003. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiology*, v.132, n.1, p.44–51.
- Walling, L. L. 2000. The myriad plant responses to herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation*, v.19, n.2, p.195–216.
- Wani, P. A.; Khan, M. S.; Zaidi, A. 2007. Co-inoculation of nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacteria to promote growth, yield and nutrient uptake in chickpea. *Acta Agronomica Hungarica*, v.55, p.315-323.
- Wardle, D. A.; Zackrisson, O.; Nilsson, M.-C. 1998. The charcoal effect in boreal forests: mechanisms and ecological consequences. *Oecologia*, v.115, p.419–426.
- Warnock, D. D.; Lehmann, J.; Kuyper, T. W.; Rilling, M. C. 2007. Mycorrhizal responses to biochar in soil – concepts and mechanisms. **Plant Soil**, v.300, n.1, p.9–20.
- Wei, C. T. 1950. “Notes on *Corynespora*.” Mycological Papers, No. 34. Commonwealth Mycological Institute Kew. p.10.
- Wei, G.; Kloepper, J. W.; Tuzun, S. 1991. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by selected strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, v.81, n.12, p.1508-1512.
- Xie, S.; Wu, H.; Zang, H.; Wu, L.; Zhu, Q.; Gao, X. 2014. Plant growth promotion by spermidine-producing *Bacillus subtilis* OKB105. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.27, p.655–663. 10.1094/MPMI-01-14-0010-R.

Yorinori, J. T.; Homechin, M. 1977. Doenças de soja identificadas no Estado do Paraná no período de 1971 a 1976. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.2, n.1, p.108.